



Synthèse d'analogues de l'acide glutamique par transamination enzymatique: Synthèse et Modélisation

Emmanuelle Sagot

► To cite this version:

Emmanuelle Sagot. Synthèse d'analogues de l'acide glutamique par transamination enzymatique: Synthèse et Modélisation. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2007. Français. NNT : 2007CLF21788 . tel-00718372

HAL Id: tel-00718372

<https://theses.hal.science/tel-00718372>

Submitted on 16 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°d'ordre : D.U. 17 88

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
U.F.R. Sciences et Technologies

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES
N° 548

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Chimie Organique Biologique

Par

SAGOT Emmanuelle

D.E.A

**Synthèse d'analogues de l'acide glutamique par
transamination enzymatique :
Synthèse et Modélisation**

Soutenue publiquement le 16 novembre 2007 devant la commission d'examen.

Rapporteurs :

Dr. R. Dodd, Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette

Pr. P. Monsan, Laboratoire de Biotechnologies et Bioprocédés de l'INSA de Toulouse

Examineurs :

Dr. B. Aboab, Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand

Pr. J. Bolte, Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand

Dr. T. Gefflaut, Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand

Pr. D. Liotard, Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux

Remerciements

Je tiens à remercier le Pr. Jean Bolte, directeur du laboratoire SEESIB, Laboratoire de Synthèse et d'Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir donnée l'opportunité d'effectuer cette thèse, co-encadrée par le Dr. Thierry Gefflaut pour l'aspect synthèse et le Dr. Bettina Aboab dans le domaine de la modélisation moléculaire. Je leur adresse un grand merci pour la qualité de leur encadrement, pour leur disponibilité, leur patience, leurs conseils et leur écoute. J'ai eu un grand plaisir à travailler avec Thierry pour qui j'ai beaucoup d'estime, car il m'a toujours soutenue dans mon travail de synthèse au laboratoire et dans la période de rédaction. Je remercie également Bettina qui m'a initiée à la modélisation moléculaire avec beaucoup de pédagogie, de patience et de bonne humeur.

Je remercie également les membres du jury, le Pr. Monsand, le Dr. Dodd et Dr. Liotard pour bien avoir voulu juger mon travail de thèse.

Un grand merci va à toute l'équipe Bioconversion dirigée par le Pr. Laurence Hecquet. J'adresse mes sincères remerciements à Laurence Hecquet, Frank Charmantray, Virgil Helaine, Agnès Rambourdin et plus particulièrement à Marielle Lemaire. Marielle, merci pour ton aide, ta gentillesse, pour tes conversations, et je garderai de très bons souvenirs de nos escapades en Autriche et en Espagne. Je remercie Stéphanie Bonnefoy pour sa sympathie et sa bonne humeur qui apporte beaucoup de gaieté au secrétariat. Je voudrais aussi remercier Simon Butet, Emmanuel Idelfonso et Aurélie Namoune, stagiaires que j'ai encadrés dans le cadre de ma thèse.

Je voudrais aussi remercier Arnaud Gautier, le « pro de la chimie Click » pour son aide et Vincent Thery qui m'a secourue de nombreuses fois en modélisation moléculaire et qui a fait preuve de beaucoup de patience et de calme !

Je tiens également à féliciter mes collègues de bureau pour leur aptitude à m'avoir supportée ! Merci à toi Docteur Lahssen ! Et merci aussi au futur « doc. Greg » pour qui j'ai beaucoup d'amitié.

Je n'oublierai pas non plus d'adresser un grand merci à tous mes compagnons de l'amicale du café avec qui j'ai passé de bons moments de détente. Je tiens aussi à remercier tous les sortants du SEESIB. J'embrasse Nico, Marlène, Zab, Hélène, Stéphanie, Pierre, Stéphane et Radouane.

J'adresse un sincère remerciement à ma coloc d'enfer, An-So. Sa bonne humeur et sa personnalité hors du commun m'ont beaucoup aidé lors des moments durs de la thèse. Un grand merci également à mes camarades toujours partant pour l'apéro traditionnel du jeudi soir ! Merci à Moun, Nono, Soso, Emilie, Greg, An-so et Nico. Je n'oublierai pas non plus Carlos pour son amitié, sa joie de vivre et nos rigolades à l'heure du déjeuner !

Je remercie du plus profond du cœur Yannick pour son soutien et son amour.

Pour terminer, j'ai une pensée toute particulière pour mes parents et leurs compagnons respectifs ainsi que pour mon frère qui m'a beaucoup manquée lors de ces six dernières années.

Abréviations

A

ACS : acide cystéine sulfinique

AlaAT : Alanine aminotransférase

AMPA : acide (*S*)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionique

AMPA : récepteur AMPA

APAT : Alanine:pyruvate aminotransférase

AspAT : Aspartate aminotransférase

AT : aminotransférase

B

BCAT : Branched chain aminotransferase

Bn : Benzyle

BOC : *tert*-butyloxycarbonyl

Bu : Butyle

C

Cbz : benzyloxycarbonyl

D

DAAO : D-aminoacide oxydase

DABCO : Diazabicyclo[2.2.2]octane

DBU : 1,8 diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène]

DMAP : Diméthylaminopyridine

DMP : diméthoxypropane

E

EAAT : Transporteur d'aminoacides excitateurs

E. coli : *Escherichia coli*

F

FDH : Formate déshydrogénase

G

GABA-AT : γ -aminobutyrate-AT

GluDH : Glutamate Déshydrogénase

GluR : récepteur du Glu

I

IBCF : Chloroformate d'isobutyle

iBu : isobutyle

iGluR : récepteur ionotrope du glutamate

iPr : isopropyle

iPn : isopentyle

K

KA : kainate

KAR : récepteur KA

KG : 2-oxoglutarate

KHMDS : Hexaméthylidisylilamidure de potassium

L

LDA : Diisopropylamidure de Lithium

LDH : Lactate déshydrogénase

LHMDS : Hexaméthylidisylilamidure de lithium

LICA : isopropylcyclohexylamidure de Lithium

M

mGluR : Récepteur metabotrope du glutamate

N

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

NAla : Naphtylalanine

NMDA : N-méthyl-D-Asp

NMDAR : récepteur NMDA

NMM : N-méthylmorpholine

O

OA : Oxaloacétate

OrnAT : Ornithine aminotransférase

P

PDB : protein data bank

PEG : polyéthylèneglycol

Pn : pentyle

Pf : 9-phénylfluorényle

PLP : phosphate de pyridoxal

R

Réf : Référence

S

SNC : Système nerveux central

T

Ta : Température ambiante

TBDMS : tert-Butyl-diméthylsilyle

tBu : *tert*-Butyle

THF : Tétrahydrofurane

TK : Transcétolase

TMS : Triméthylsilyle

V

VGluT : transporteur visiculaire du glutamate

Glossaire

Epilepsie : ensemble des symptômes caractérisés par des crises répétitives qui sont l'expression clinique d'une décharge électrique anormale, soudaine, excessive et transitoire du SNC. Les symptômes les plus fréquents sont la perte de connaissance et l'apparition de convulsions.

Hypoxie : lorsque la quantité d'oxygène délivré aux tissus est insuffisante par rapport aux besoins cellulaires.

Ischémie : diminution de l'apport sanguin artériel d'organe. Cette diminution entraîne essentiellement une baisse de l'oxygénation des tissus de l'organisme (hypoxie).

Maladie d'Alzheimer : maladie dégénérative du SNC qui se manifeste par des pertes de mémoire, de jugement, de raisonnement, de difficulté à faire des tâches quotidiennes, des changements d'humeur et des troubles du comportement. Cette maladie détruit progressivement les neurones.

Maladie d'Huntington : une personne sur 5 000 est touché par cette maladie génétique. Elle entraîne la perte de neurones dans une partie spécifique du cerveau appelé noyaux gris centraux. Les symptômes se traduisent par des mouvements erratiques, dépression et anxiété.

Maladie de Parkinson : maladie neurodégénérative du SNC qui se manifeste principalement par des ralentissements des mouvements et des tremblements des membres au repos.

Effets psychotomimétiques : « qui simule les psychoses ». Les molécules qui ont des effets psychotomimétiques sur l'organisme entraînent des changements de la perception, de la pensée, du jugement sans induire une atteinte définitive de la mémoire et de l'orientation.

Préface

Ma thèse s'est déroulée au sein de l'équipe Bioconversion du laboratoire SEESIB sous la tutelle du Pr. Jean Bolte et sous le co-encadrement du Dr. Thierry Gefflaut et du Dr. Bettina Aboab.

Ce mémoire se compose de deux grandes parties : l'une traite de la synthèse des analogues de l'acide glutamique et l'autre de l'étude de modélisation moléculaire sur l'Aspartate Aminotransférase.

Sommaire

<i>Remerciements</i>	<u>3</u>
<i>Abréviations</i>	<u>5</u>
<i>Glossaire</i>	<u>9</u>
<i>Préface</i>	<u>11</u>
<i>Sommaire</i>	<u>13</u>

PARTIE I : Synthèse des analogues du Glu

Etude bibliographique

Chapitre I Le système Glutamatergique-Pharmacologie ____ **25**

I.1 Importance physiologique du Glu _____ **25**

I.2 Le système glutamergique du système nerveux central _____ **26**

Chapitre II Les principales méthodes de synthèse d'analogues du Glu _____ **50**

II.1 Synthèse à partir du L-Glu _____ **50**

II.2 Alkylation de l'acide pyroglutamique (pGlu) _____ **53**

II.3 Formation de la liaison C²-C³ _____ **56**

II.4 Formation de la liaison C³-C⁴ _____ **59**

II.5 Méthodes chimio-enzymatiques pour la synthèse d'analogues du Glu optiquement purs _____ **60**

Chapitre III Les Aminotransférases _____ **63**

III.1 Généralités et classification _____ **63**

III.2 Mécanisme d'action _____ **66**

Chapitre IV Synthèse d'analogues du Glu par transamination : travaux antérieurs _____ **81**

IV.1 Préparation des analogues du KG _____ **81**

IV.2 Etude et utilisation de l'AspAT _____ **87**

IV.3 Utilisation de la BCAT, enzyme complémentaire à l'AspAT _____ **93**

Résultats § Discussion

Chapitre I Synthèse des analogues du KG fonctionnalisés en 4 109

<i>I.1 Utilisation de la condensation de Michael et de l'oxydation d'acétates d'énol</i>	109
<i>I.2 Développement d'une nouvelle méthode générale : synthèse d'analogues fonctionnalisés du KG à partir de la cyclohexanone 2,4-dicarboxylate de méthyle</i>	126
<i>I.3 Préparation d'analogues phosphoniques du KG</i>	136
<i>I.4 Préparation d'un analogue hétérocycliques du KG</i>	138

Chapitre II Etude des réactions de transamination 143

<i>II.1 Disponibilité de l'AspAT et de la BCAT</i>	143
<i>II.2 Etude de la spécificité de substrat de l'AspAT</i>	146
<i>II.3 Etude de la spécificité de substrat de la BCAT</i>	153

Chapitre III Préparation des analogues du Glu par transamination enzymatique avec l'AspAT 159

<i>III.1 Procédé biocatalytique</i>	159
<i>III.2 Résultats</i>	161

Chapitre IV Synthèse de nouveaux analogues du Glu par cycloaddition à partir du composé 33b 165

<i>IV.1 Introduction : choix du dérivé 33b comme précurseurs</i>	165
<i>IV.2 Réaction de Huisgen et click chemistry</i>	165
<i>IV.3 Vers la préparation d'un substrat donneur lié à un polymère</i>	166
<i>IV.4 Préparation de biligands ...</i>	171

Chapitre V Evaluation biologique des analogues du Glu 177

<i>V.1 Tests biologiques sur les EAATs</i>	177
<i>V.2 Tests pharmacologiques sur les iGluRs</i>	181
<i>V.3 Conclusion</i>	184

Chapitre VI Conclusion générale et perspectives 185

PARTIE II : Etude de modélisation moléculaire de l'AspAT

Etude bibliographique

Chapitre I Introduction à la modélisation moléculaire	195
<i>I.1 Introduction et domaines d'application</i>	195
<i>I.2 Les méthodes de calcul de l'énergie d'une molécule</i>	195
Chapitre II L'Aspartate Aminotransférase	205
<i>II.1 Origine</i>	205
<i>II.2 Structures</i>	205
<i>II.3 Etude du site actif</i>	207
<i>II.4 Conclusion</i>	226

Résultats § Discussion

Chapitre I Etude de l'intermédiaire aldimine externe	233
<i>I.1 Construction du modèle de référence : complexe AspAT-KG</i>	233
<i>I.2 Etude de l'énantiosélectivité de l'AspAT</i>	235
<i>I.3 Modèle de prédiction d'activité</i>	240
<i>I.4 Vers d'éventuels substrats immobilisés</i>	246
<i>I.5 Etude des dérivés comprenant les fonctions ester et amide</i>	250
Chapitre II Etude de l'intermédiaire cétimine	253
<i>II.1 Construction du modèle de référence pour l'intermédiaire cétimine : complexe AspAT-KG</i>	253
<i>II.2 Analyse de l'énantiosélectivité de l'AspAT sur la base des complexes cétimines</i>	256
Chapitre III Conclusion et perspectives	259

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I Synthèse des analogues du KG 5	263
<i>I.1 Généralités</i>	263
<i>I.2 Synthèse de l'acide 2-(benzyloxymethyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5a</i>	264
<i>I.3 Synthèse de l'acide 2-(hydroxymethyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5i</i>	268
<i>I.4 Synthèse de l'acide 2-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-4-oxopentanedioate de dilithium 5b</i>	269
<i>I.5 2-((4-(azidomethyl)benzyloxy)methyl)-4-oxoglutamate de diméthyle 4c</i>	273
<i>I.6 Synthèse de l'acide 4-oxobutane-1,2,4-tricarboxylate de lithium 5d</i>	276
<i>I.7 Synthèse de l'acide 2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5e</i>	278
<i>I.8 Synthèse de l'acide 6-methoxy-3-(methoxycarbonyl)-5,6-dioxohexanoïque 4j</i>	282
<i>I.9 2-hydroxy-6-oxo-1-propylpiperidine-2,4-dicarboxylate de dilithium 5k</i>	285
<i>I.10 2-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-4-oxoglutamate de dilithium 5l</i>	287
<i>I.11 Synthèse de l'acide 2-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5g</i>	288
<i>I.12 Synthèse du 6-oxoheptane-1,3,5-tricarboxylate de 3,5-ditertbutyl et de 1-méthyle 2h</i>	292
<i>I.13 Synthèse de l'acide 2-(3-amino-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5m et de analogues 5n-r</i>	294
<i>I.14 Synthèse de l'acide 2-((2-(2-(2-(4-((2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-4-oxoglutamate de dilithium 5t</i>	307
<i>I.15 Synthèse de l'acide 2 céto-4-phosphorylbutanoate de lithium 26</i>	309
<i>I.16 Synthèse de l'acide 2-carboxylique-3-(methoxycarbonyl)-4-oxoazetidine 30 et de son analogue 32</i>	311
<i>I.17 Synthèse du 10-(5-(prop-2-ynyl)oxy)pentyl)acridin-9(10H)-one 37</i>	314
<i>I.18 Synthèse de 4,7,10,13-tetraoxahexadeca-1,15-diyne 38</i>	315
<i>I.19 Synthèse de 2,2-diméthyl-6,9,12,15-tetraoxa-2-silaoctadeca-3,17-diyne 39</i>	316
<i>I.20 Synthèse du 3-(2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-yne 40</i>	317
 Chapitre II Synthèse des analogues de l'acide Glutamique 33	 318
<i>II.1 Généralités</i>	318
<i>II.2 Protocole général de transamination avec l'AspAT d'E.coli</i>	318
<i>II.3 Protocole de dosage du KG pour le suivi de la transamination</i>	318
<i>II.4 Protocole de dosage du pyruvate pour le suivi de la transamination</i>	318
<i>II.5 Acide (2S,4S) 1,2,4-tricarboxylic-4-aminobutane 33d</i>	319
<i>II.6 Acide (2S,4S)-4-(benzyloxymethyl)glutamique 33a</i>	319

<i>II.7 Acide (2S,4S)-4-(hydroxymethyl)glutamique 33i</i>	320
<i>II.8 Acide 6-oxopiperidine-2,4-dicarboxylique 34</i>	320
<i>II.9 Acide (1S,3R) 1,3,5-tricarboxylic-1-aminopentane 33s</i>	321
<i>II.10 Acide (2S,4R)-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)glutamique 33g</i>	321
<i>II.11 Acide (2S,4R)-4-(3-(methylamino)-3-oxopropyl)glutamique 33n</i>	322
<i>II.12 Acide (2S,4R)-4-(3-(propylamino)-3-oxopropyl)glutamique 33o</i>	322
<i>II.13 Acide (2S,4R)-4-(3-(benzylamino)-3-oxopropyl)glutamique 33p</i>	323
<i>II.14 Acide (2S,4R)-4-(3-(2,2-diphenylethylamino)-3-oxopropyl)glutamique 33q</i>	324
<i>II.15 Acide (2S,4R)-4-(3-amino-3-oxopropyl)glutamique 33m</i>	324
<i>II.16 Acide (2S,4R)-4-(3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethylamino)-3-oxopropyl)glutamique 33r</i>	325
<i>II.17 Acide (2S,4S)-4-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique 33b</i>	325
<i>II.18 Acide (2S,4S)-4-((2-(2-(2-(4-((2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique 33t</i>	326
<i>II.19 Acide (2S,4S)-4-((2-(2-(2-(4-((6-(9-oxoacridin-10(9H)-yl)hexyloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique 33u</i>	327
<i>II.20 Acide (2S,4S)-4-((2-(2-(2-(4-((2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique 33x</i>	327
<i>II.21 Acide (2S,4S)-4-((2-(2-(2-(4-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique 33y</i>	328
<i>II.22 Diglutamate 33v</i>	329

Chapitre III Enzymologie 331

<i>III.1 Généralités</i>	331
<i>III.2 Protocole du dosage d'activité pour la détermination des paramètres cinétiques d'un substrat de l'AspAT</i>	331
<i>III.3 Protocole pour l'étude de l'inhibition de l'AspAT par le 4-carboxyméthyl-KG 5d</i>	331
<i>III.4 Protocole du dosage d'activité pour la détermination des paramètres cinétiques d'un substrat de la BCAT avec la GluDH</i>	332
<i>III.5 Protocole du dosage d'activité pour la détermination des paramètres cinétiques d'un substrat de la BCAT avec la LeuDH.</i>	332
<i>III.6 Protocole pour la détermination de la constante d'équilibre pour la transamination entre un donneur d'amine et le KG avec l'AspAT</i>	332
<i>III.7 Protocole pour la culture des souches d'E.coli TYR903-AspC et la purification de l'AspAT d'E.coli</i>	332

PARTIE I

SYNTHESE DES ANALOGUES DE L'ACIDE GLUTAMIQUE

Etude Bibliographique

Introduction

Cette étude bibliographique se compose de quatre grandes parties :

Dans une première partie, le rôle de l'acide Glutamique (Glu) dans le système nerveux central des vertébrés est décrit en insistant sur les efforts déployés par la recherche pharmaceutique pour le design et la synthèse d'analogues du Glu et de molécules actives dans le système glutamatergique. Cette partie a pour but de donner une vue d'ensemble des divers composés qui ont ou pourraient avoir des effets thérapeutiques et apporter des solutions pour le traitement de troubles du système nerveux incluant les accidents cérébraux, diverses maladies mentales dans lesquelles le système glutamatergique est impliqué.

Une seconde partie est consacrée aux principales méthodes décrites dans la littérature permettant la préparation stéréosélective d'analogues du Glu. Le chapitre III donne une description des Aminotransférases (ATs), de leurs application en synthèse et des principales stratégies employées pour la mise au point de procédés biocatalytiques.

Enfin, la dernière partie relate les travaux antérieurs à ma thèse, réalisés au laboratoire et portant sur la synthèse d'analogues du Glu par transamination enzymatique. En effet, ce sujet a fait l'objet de plusieurs études au laboratoire auxquels sept étudiants ont participé pleinement : F. Echalié (thèse, 1994), V. Hélaine (thèse, 1999), S. Alaux (thèse en 2002), M. Xian (post-doc, 2003), X. Gu (Master, 2003), V. Maurat (Master, 2004) et M. Chapelet (Master, 2002). Cette description précède la présentation de mon projet de thèse qui m'a été confié il y déjà trois ans.

Chapitre I Le système Glutamatergique-Pharmacologie

I.1 Importance physiologique du Glu

L'acide L-glutamique (Glu), acide aminé naturel constituant de toutes protéines, joue un rôle clé dans le métabolisme de tout être vivant sur Terre. Il est souvent associé à deux de ses analogues structuraux : l'acide α -céto glutarique (KG) et la Glutamine (Gln) dans les réactions décrites dans le schéma ci-dessous.

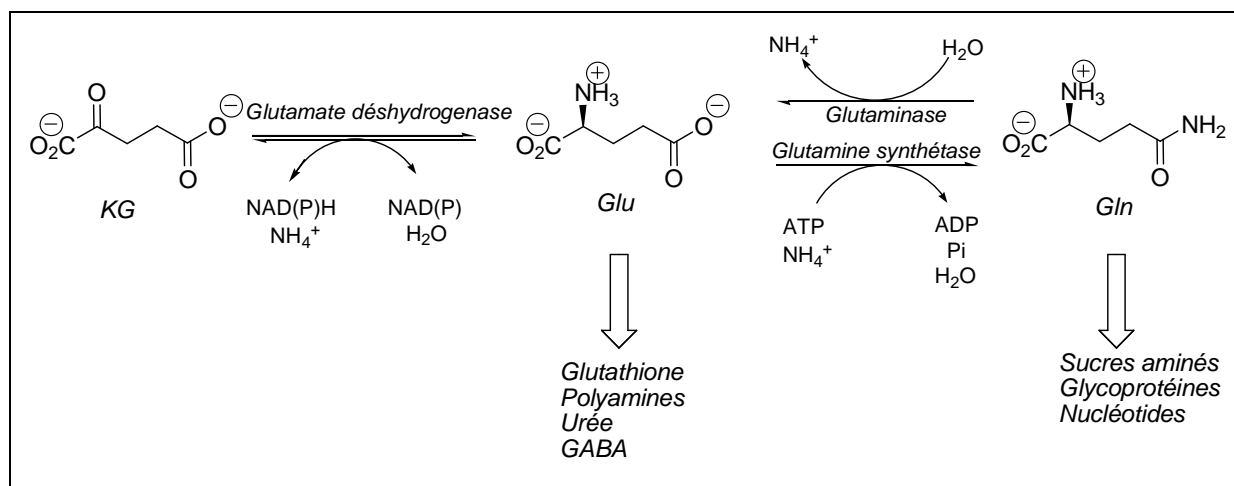


Schéma 1: rôle du Glu dans l'incorporation de l'azote.

Le KG, principalement issu du cycle de l'acide citrique (ou cycle de KREBS) est converti en Glu par amination réductrice catalysée par la Glutamate deshydrogénase ou par transamination. Le Glu peut à son tour, former la Gln par incorporation d'ammoniac sous l'action de la glutamine synthetase. Ces deux enzymes sont présentes chez tous les êtres vivants. Le Glu et la Gln sont donc des sources d'azote qui contribuent à la synthèse de nombreuses molécules essentielles à la vie comme les protéines et les acides nucléiques. La figure 1 montre la forte implication du Glu dans le métabolisme humain.

Par ailleurs, il est apparu dans les années 50, que le Glu possède un rôle fondamental dans la communication cellulaire au sein du système nerveux central (SNC) des vertébrés. Il est aujourd'hui reconnu comme le principal neurotransmetteur excitateur^{1,2,3}. De plus, son implication dans la communication cellulaire au niveau périphérique^{4,5} et au niveau du système immunitaire⁶ apparaît de plus en plus évidente.

¹ J. C. Watkins, *Biochem. Soc.*, **2000**, 28, 297-310.

² M. Nedergaard, T. Takano, A. J. Hansen, *nature review, neuroscience*, **2002**, 748-755.

³ J. C. Watkins, D. E. Jane, *British j. Pharm.*, **2006**, 147, S100-S108.

⁴ E. Hinoi, T. Takarada, T. Ueshima, Y. Tsuchihashi, Y. Yoneda, *Eur. J. Biochem.*, **2004**, 271, 1-13.

⁵ L. Hertz, *Neurochem. Inter.*, **2006**, 48, 416-425.

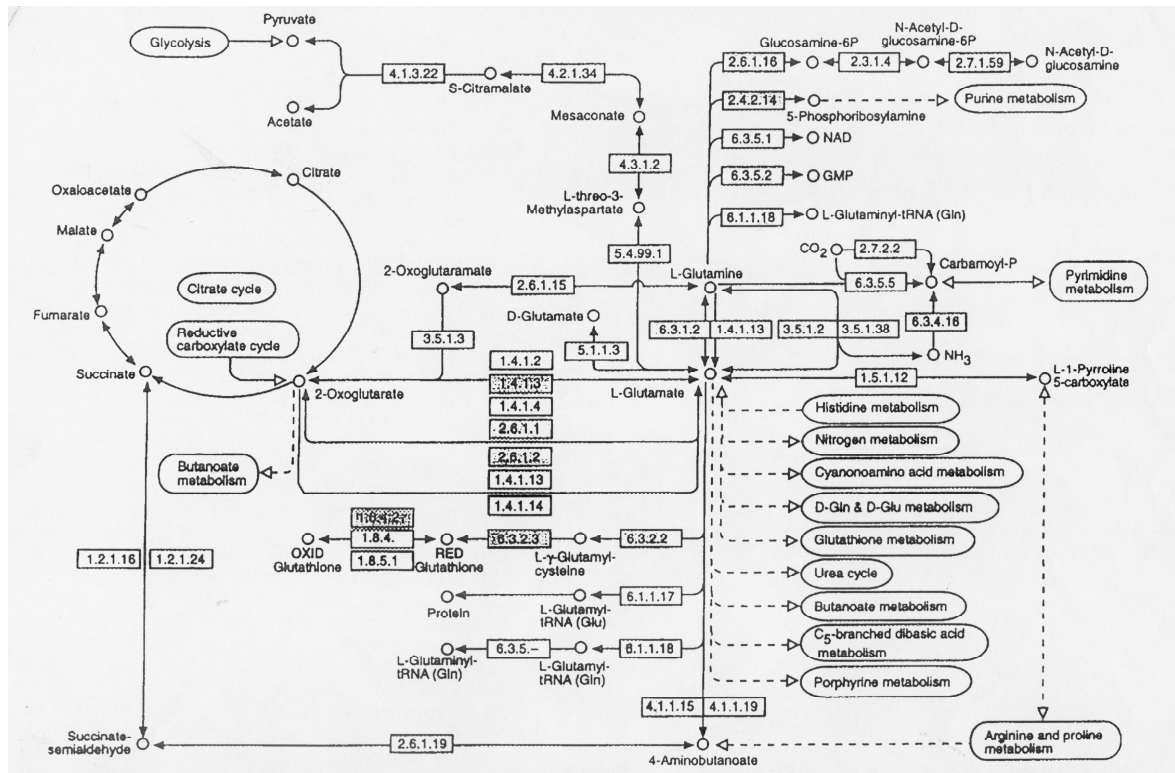


Figure 1 : Carte métabolique du Glu (GenomeNet Database Service : www.genome.ad.jp)

1.2 Le système glutamergique du système nerveux central

Le Glu joue un rôle dans la transduction du signal au niveau de la terminaison des cellules nerveuses c'est-à-dire des synapses chimiques de type excitatrice. Sa répartition dans le cerveau est très inégale : sa concentration est de l'ordre du micromolaire dans le domaine extracellulaire alors qu'elle peut atteindre une centaine de millimolaires à l'intérieur des vésicules synaptiques.

Le Glu est essentiellement produit par transamination à partir du KG dans les neurones et les cellules gliales. La figure 2 décrit le parcours du Glu à l'intérieur d'une synapse.

Dans les cellules gliales (dont les astrocytes), le Glu est converti en Gln avant d'être libéré dans le domaine extracellulaire. La Gln diffuse jusqu'au neurone où elle sera internalisée par des transporteurs spécifiques et reconvertie en Glu. Les molécules de Glu sont transportées par des protéines spécifiques (**VGluT**) dans les vésicules synaptiques où elles sont stockées.

⁶ A. A. Boldyrev, D. O. Capenter, P. Johnson, *J. Neurochem.*, **2005**, 95, 913-918

Au cours de la transmission de l'excitation nerveuse, le potentiel d'action (PA) atteint les terminaisons nerveuses et produit la libération de glutamate ainsi concentré dans les vésicules pré-synaptiques.

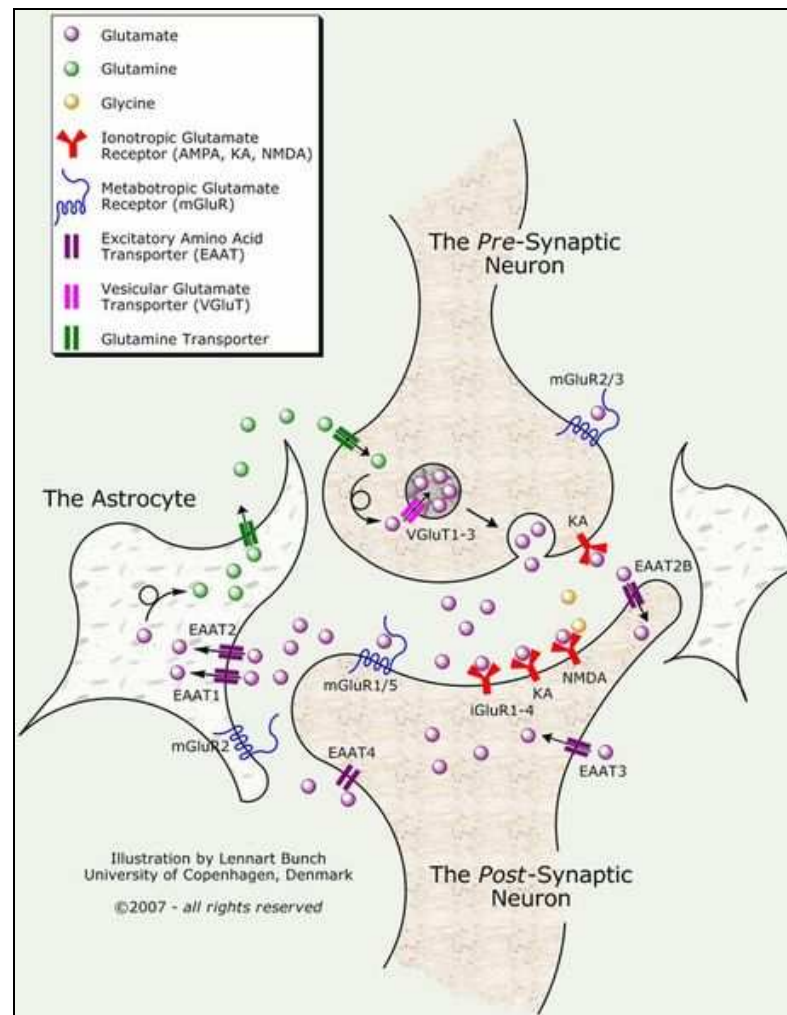


Figure 2 : transmission d'information au niveau d'une synapse chimique du SNC

Le glutamate diffuse dans la fente synaptique et atteint les récepteurs ionotropiques (**iGluR**) post-synaptiques. L'activation de ces récepteurs est liée à l'ouverture de canaux ioniques et produit des variations de concentration d'ions qui induisent un courant (nouveau PA). Le glutamate libéré est ensuite recapturé par des transporteurs (**EAAT**) au niveau des cellules gliales mais aussi des neurones. Le Glu peut aussi se fixer sur des récepteurs du type métabotropiques (**mGluR**) dont l'activation entraîne une cascade de réactions biochimiques.

Une concentration trop élevée en Glu dans le domaine inter synaptique peut entraîner une suractivation des iGluR et ainsi provoquer la mort des neurones. Ce phénomène est connu sous le nom d'excitotoxicité et est notamment à l'origine de lésions cérébrales consécutives à l'ischémie ou à d'autres accidents cérébraux. C'est pourquoi l'évacuation des molécules de Glu de la fente

synaptique par les transporteurs EAATs, doit se faire le plus rapidement possible de telle sorte à garder une concentration non toxique pour les neurones.

Le tableau ci-après présente les différents types de récepteurs du Glu existants dans le SNC et que nous décrirons par la suite.

RECEPTEURS DU GLUTAMATE : GluR					
Récepteurs ionotropiques : iGluR			Récepteurs métabotropiques : mGluR		
NMDA	AMPA	Kainate	Groupe I	Groupe II	Groupe III
<i>NR1</i>	<i>GluR1</i>	<i>GluR5</i>			<i>mGluR4 a-b</i>
<i>NR2 A-D</i>	<i>GluR2</i>	<i>GluR6</i>	<i>mGluR1 a-d</i>	<i>mGluR2</i>	<i>mGluR6</i>
<i>NR3 A-B</i>	<i>GluR3</i>	<i>GLuR7</i>	<i>mGluR5 a-b</i>	<i>mGluR3</i>	<i>mGluR7 a-b</i>
	<i>GluR4</i>	<i>KA-1</i>			<i>mGluR8 a-b</i>
		<i>KA-2</i>			

Tableau 1 : Famille des récepteurs du Glutamate.

Les récepteurs et les transporteurs du Glu sont donc essentiels pour maintenir le bon fonctionnement et l'intégrité des cellules nerveuses. C'est pourquoi l'identification et l'étude des rôles spécifiques de chaque récepteur et transporteur du Glu s'avèrent très importantes pour la compréhension de certains dysfonctionnements du SNC (épilepsie, maladies de Parkinson, d'Huntington, d'Alzheimer, schizophrénie ...). De nombreuses études ont porté sur la préparation de molécules ayant des activités agonistes ou antagonistes sélectives des récepteurs et transporteurs du Glu et qui peuvent parfois, avoir des effets thérapeutiques sur certains troubles du système nerveux.

I.2.1 Les transporteurs du Glu (GluTs) dans le SNC

A. Description

Il existe deux types de transporteurs du Glu : les transporteurs Na^+ dépendants nommés EAATs chez les hommes (Excitatory Amino Acids Transporters) et les transporteurs qui interviennent au niveau des vésicules synaptiques notés VGluTs (Vesicular Glutamate Transporters, figure 3).

Les EAATs sont divisés en cinq sous groupes et les VGluTs en trois comme le montre le tableau suivant. Les transporteurs GLAST (EAAT1 chez l'homme) et GLT-1 (EAAT2 chez l'homme) se situent au niveau des cellules gliales du SNC alors que les transporteurs EAAC1 (EAAT3 chez l'homme), EAAT4 et EAAT5 véhiculent le Glu à travers les membranes des cellules

nerveuses. Ces transporteurs sont responsables de la terminaison du signal de transduction dont le Glu est le médiateur et empêche la neurotoxicité causée par une concentration trop élevée en Glu dans la fente synaptique.

Transporteurs	localisation
Sous groupes de GluT :	
EAAT1	Cerveau, rétine, testicules, os
EAAT2	Cerveau, rétine, foie
EAAT3	Cerveau, intestin, reins, rétine, foie, cœur
EAAT4	Cerveau, placenta
EAAT5	Rétine, foie
Sous groupes de VGluT	
VGLUT1	Cerveau, os
VGLUT2	Cerveau, pancréas, glande pinéal
LGLUT3	Cerveau, rétine, foie

Tableau 2: les différents types de transporteurs du Glu identifiés chez l'homme.

Le transport du Glu par les EAATs est dirigé par un courant membranaire causé par un gradient de concentration en cations Na^+ et K^+ à travers la membrane qui est lui-même assuré par un transporteur annexe ATP dépendant (Figure 3). Ainsi, le transport d'une molécule de Glu est couplé à un co-transport de 2 ions Na^+ , d'un H^+ et à la sortie d'un cation K^+ .

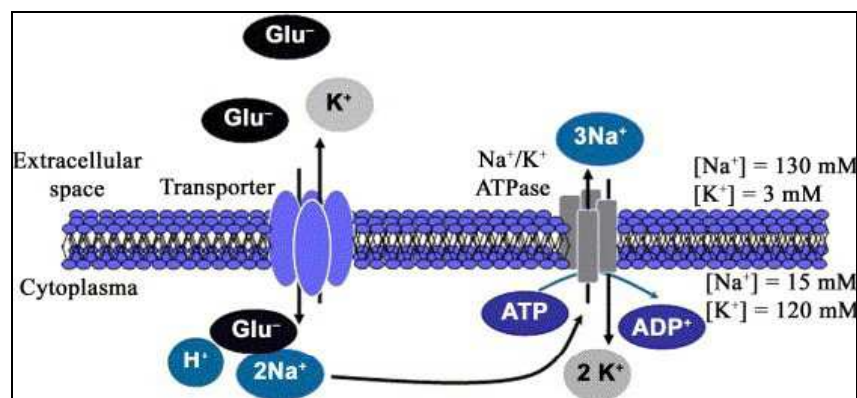


Figure 3 : schéma des transporteurs Na^+ dépendants⁷.

En plus de ces échanges d'ions, le Glu semble activer le transport d'ions chlorure en particulier à travers les EAAT4 et 5. La stœchiométrie indique l'entrée nette d'une charge positive, ce qui se traduit par la polarisation de la membrane. Comme nous le verrons dans la partie Résultats

⁷ A. Camacho, L. Massieu, *Arch. Med. Res.*, **2006**, 11-8.

et Discussion, cette propriété permet d'étudier l'activité de transport des EAATs notamment par des expériences électrophysiologiques⁸.

Récemment, trois sous-types de transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT1, 2 et 3), de séquences très conservées (plus de 70 % d'homologie), ont été isolés et caractérisés^{9,10,11}. En remplissant les vésicules synaptiques, les VGLUTs réalisent une fonction clé pour la sécrétion du Glu. Ils sont également les premiers marqueurs protéiques spécifiques des cellules glutamatergiques. Les VGLUTs sont enchâssés dans la membrane des vésicules synaptiques par dix domaines transmembranaires comme le montre la figure ci-dessous.

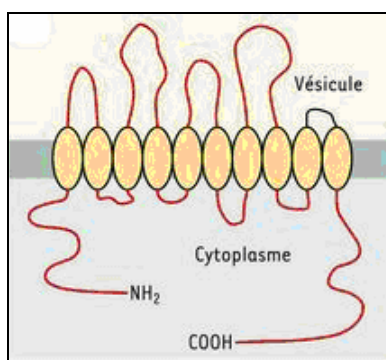


Figure 4 : Transporteur vésiculaire VGLUT.

A la recherche d'inhibiteurs potentiels sélectifs des GluTs, les scientifiques ont évalué des analogues contraints du Glu et de l'Asp. En effet, l'introduction de groupements volumineux ou de cycle au niveau du squelette du Glu a pour but d'engendrer de fortes contraintes conformationnelles et de bloquer sélectivement les protéines transporteur.

Il peut exister deux types d'inhibiteurs des GluTs : les inhibiteurs substrats qui entrent en compétition avec le Glu et qui sont transportés, et les inhibiteurs non substrats qui bloquent les transporteurs sans être internalisés.

L'inhibition des transporteurs présente des applications thérapeutiques potentielles. En effet, il peut être primordial de bloquer ces GluTs dans certaines conditions comme dans le cas d'ischémie, d'épilepsie ou encore d'hypoxie : lors de ces accidents, les gradients ioniques entretenus par les pompes Na^+/K^+ -ATP dépendantes sont fortement perturbés. Le flux du Glu à travers les EAATs est inversé conduisant alors au phénomène d'excitotoxicité et à la mort neuronale.

⁸ D. Attwell, *Am. Soc. Nutr. Sc.*, **2000**, 1023S-1025S.

⁹ S. Takamori, J. S. Rhee, C. Rosenmund, et al., *Nature* **2000**, 407, 189-94.

¹⁰ E. E. Bellocchio, R. J. Reimer, R. T. Fremeau, et al. *Science*, **2000**, 289, 957-60.

¹¹ R. T. Fremeau, S. Voglmaier, R. P. Seal, et al. *Trends Neurosci.*, **2004**, 27, 98-103.

B. Pharmacologie des EAATs^{12,13}

Les L- et D-Asp se sont avérés être des inhibiteurs substrats des EAATs. Des dérivés du β -*thréo*-hydroxyaspartate sont connus pour avoir des activités inhibitrices vis à vis des EAATs. Le **TBOA** est la molécule qui présente une des meilleures activités inhibitrices décrites à ce jour ($K_i = 0,1 \mu\text{M}$ vis-à-vis des EAAT2). Cependant TBOA présente une faible sélectivité puisqu'il inhibe aussi les autres EAATs ($K_i = 1$ à $10 \mu\text{M}$) et montre également une faible activité vis-à-vis des récepteurs NMDA ($\text{IC}_{50} = 65 \mu\text{M}$). D'autres hydroxyaspartates substitués comme le **TMOA** présentent une meilleur sélectivité pour les EAAT2 et 5. Des analogues de TBOA tel que **TFB-TBOA** ont une affinité plus importante que TBOA ($\text{IC}_{50} = 22, 17$ et 300 nM respectivement vis-à-vis des EAAT1-3). De plus TFB-TBOA est inactif vis-à-vis des GluRs.

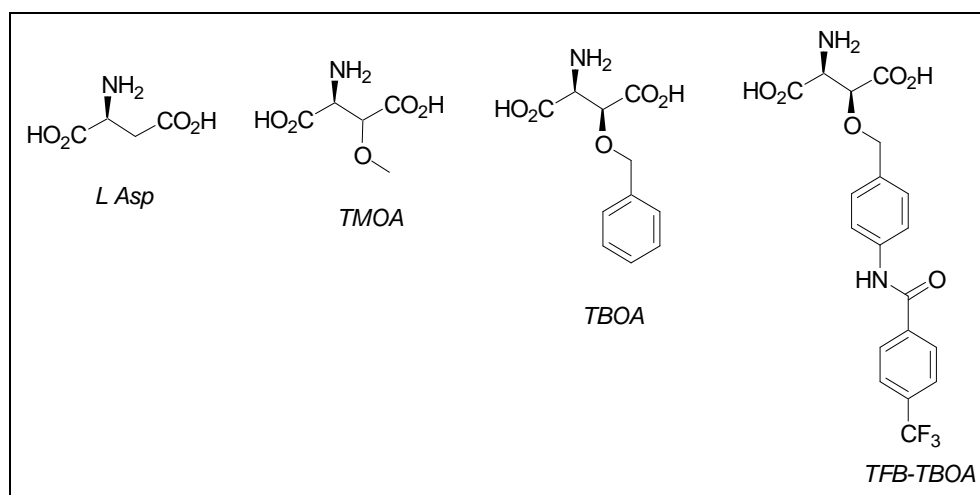


Figure 5 : analogues de l'Asp inhibiteurs non substrats des EAATs.

L'introduction de substituants sur le squelette du Glu a permis de révéler des activités inhibitrices sélectives. Ainsi, le (2*S*,4*R*)-4-méthylglutamate (**4MG**) s'avère être un inhibiteur non substrat des EAAT2 et substrat des EAAT1. Son radiomarquage a permis de caractériser sa fixation et son transport au niveau des EAAT1 et 2. Le (2*S*,3*S*)-3-méthylglutamate (**3MG**) présente une sélectivité plus marquée que le 4MG puisqu'il est inhibiteur sélectif des EAAT2 (Figure 6).

Une série d'analogues alkylés de configuration L-(2,4)-*syn* synthétisés au laboratoire a été étudiée vis-à-vis des EAAT1-3¹⁴. Toutes ces molécules sont des inhibiteurs non substrats des EAATs ne présentant aucune sélectivité marquée.

¹² A. A. Jensen, H. Bräuner-Osborne, *Biochem. Pharm.*, **2004**, 67, 2115-2127 ainsi que les publications citées.

¹³ R. J. Bridges, C. S. Esslinger, *Pharm. Therap.*, **2005**, 107, 271-285 ainsi que les publications citées.

¹⁴ S. Alaux, M. Kusk, E. Sagot, J. Bolte, A. A. Jensen, H. Bräuner-Osborne, T. Gefflaut, L. Bunch, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 7980-7992

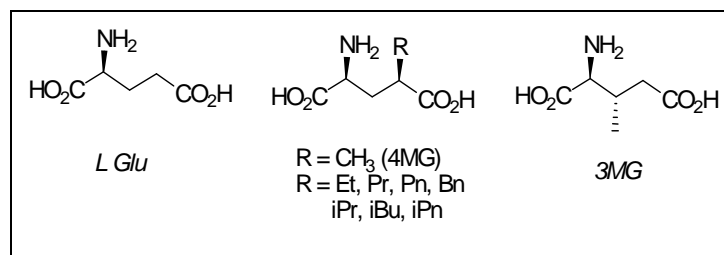


Figure 6 : analogues de Glu substitués par des groupements alkyles.

L'introduction d'un cycle sur le squelette du Glu entraîne une contrainte conformationnelle supplémentaire au sein de la molécule qui devient alors plus rigide. Ce type de substitution peut alors amener une meilleure sélectivité d'inhibition des transporteurs du Glu. La série des *L*-2-(carboxycyclopropyl)glycines (**CCG I–IV**) a été testée vis-à-vis des EAATs (figure 7). Parmi ces composés, *L*-CCG III a montré l'activité inhibitrice la plus marquée : cette molécule se comporte comme un substrat des EAAT1 et 2 (K_i respectifs = 5,5 et 2,5 μM)¹⁷. Cependant *L*-CCG III montre une affinité comparable pour les récepteurs Kainate et n'est donc pas un inhibiteur sélectif des EAATs.

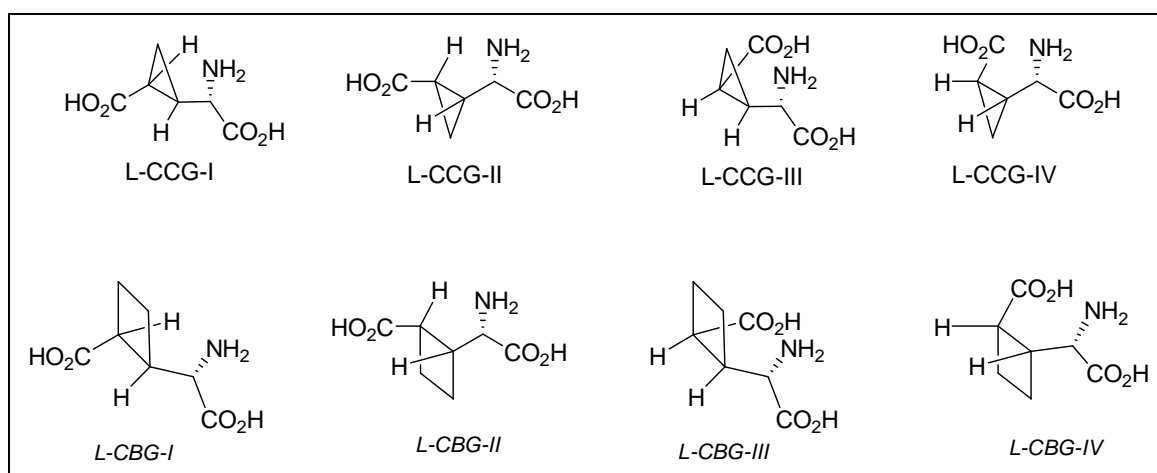


Figure 7 : Séries des *L*-CCG et *L*-CBG.

Une autre série de 2-(carboxycyclobutyl)glycines (**CBG I–IV**)¹⁵ a été synthétisée au laboratoire et testée vis-à-vis des EAATs. Parmi ces composés, seul *L*-CBG IV présente une sélectivité d'inhibition vis-à-vis des EAAT 2 et 3 (K_i respectif = 7 et 10 μM).

Parmi les molécules cycliques inhibant les transporteurs du Glu, on trouve plusieurs pyrrolidines dicarboxylées. Ainsi, le dihydrokainate (**DHK**), agoniste des récepteurs non NMDA, est un inhibiteur non substrat des EAATs sélectif du type 2 (K_i = 89 μM)¹². Dans la série des **PDC**, il est intéressant de voir qu'en variant la position du carboxylate ω sur le cycle, on retrouve soit le squelette du Glu, soit celui de l'Asp. Ainsi, le *L*-(2,3)-PDC mimant l'Asp montre une activité

¹⁵ S. Faure, A. A. Jensen, V. Maurat, X. Gu, E. Sagot, D. J. Aitken, J. Bolte, T. Gefflaut, L. Bunch, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 6532-6538.

inhibitrice vis-à-vis des EAAT2 dix fois supérieure à celle mesurée pour les autres transporteurs. Par contre, le L-(2,4)-PDC, analogue cyclique du Glu, montre une légère sélectivité envers les EAAT2, 4 et 5. Il se comporte comme un substrat alors que substitué par un méthyle en position 4, il devient inhibiteur non substrat.

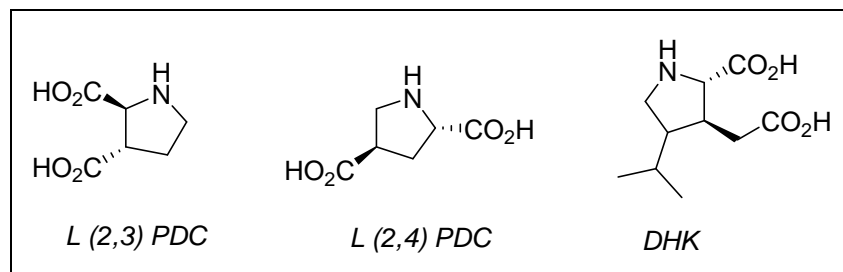


Figure 8 : Pyrolidines dicarboxylique inhibiteurs des EAATs.

Des études ont concerné d'autres hétérocycles comme des oxazoles et des oxazolines, car certains de ces composés présentent une affinité rare vis-à-vis des EAAT3. Les molécules **APOC** (substrat des EAAT3) et **POAD** (inhibiteur non substrat des EAAT3) décrites dans la figure ci-dessous en sont les principaux exemples :

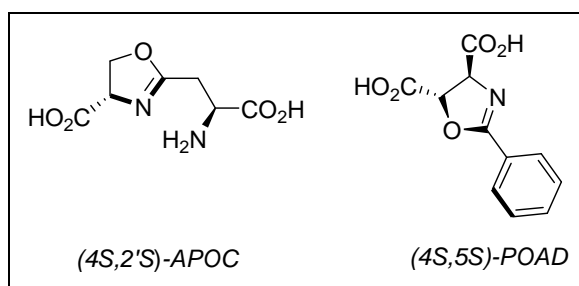


Figure 9 : exemples d'oxazolines dicarboxylique inhibiteurs sélectifs des EAAT3.

Le 3-amino-tricyclo[2.2.1.0]heptane-1,3-dicarboxylate (**WAY-855**) a été plus récemment identifiée comme un inhibiteur non substrat des EAATs avec une préférence plus marquée pour le type 2.

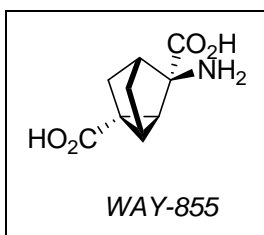


Figure 10 : structure du WAY-855.

En conclusion, une certaine quantité d'informations est disponible sur la pharmacologie des EAATs. L'EAAT2 est le transporteur le mieux caractérisé car il est le seul à présenter quelques inhibiteurs qui lui sont sélectifs. C'est pourquoi de nombreux travaux portant sur la recherche et l'élaboration de ligands sélectifs de chacun des types de transporteurs demeurent nécessaires pour élucider leurs rôles respectifs.

C. Pharmacologie des VGluTs^{16,17}

Les inhibiteurs des VGluTs, identifiés à ce jour, sont de structures variées. Certains miment le Glu et d'autres ont des structures totalement différentes. Contrairement aux EAATs, les deux isomères de l'Asp n'ont aucune activité vis-à-vis des VGluTs. La figure suivante résume les principaux inhibiteurs des transporteurs vésiculaires décrits jusqu'ici. A notre connaissance, peu de données relatives à l'inhibition sélective des différents types de VGluTs n'a été décrite à ce jour.

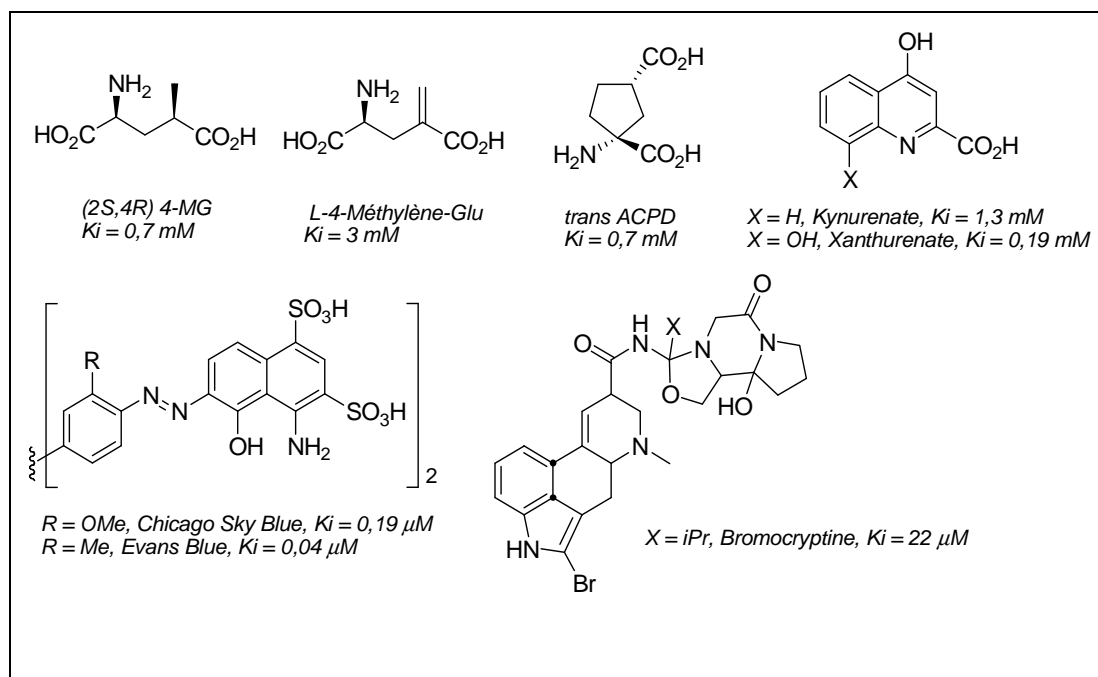


Figure 11 : principaux inhibiteurs des VGluTs.

Le **4MG** ainsi que le 4-méthylèneglutamate inhibent les VGluTs avec des constantes d'inhibition K_i de l'ordre du millimolaire¹⁸. Les K_i du *trans* **ACPD** et du Kynurenate sont aussi du même ordre de grandeur. Dans le cas des dérivés du Kynurenate, il est intéressant de voir que l'introduction d'un groupement hydroxyle en position 8 (xanthurenate) ou d'un chlore en position 7 (7-chlorokynurenate) sur le kynurenate abaisse le K_i de ces inhibiteurs respectivement à 0,19 mM et 0,59 mM.

Par ailleurs, deux des composés présentés dans la figure ci-dessus n'ont aucune ressemblance avec le substrat naturel des VGluTs mais constituent de bons inhibiteurs sélectifs.

En 2002, des dérivés de l'acide 2,4-dicarboxyquinoline (**QDC**) ont été décrits comme des inhibiteurs potentiels des VGluTs. Parmi une cinquantaine de dérivés du QCD testés¹⁹, les composés 6-phénylstéryl-QCD et 6-biphényl-4-yl-QCD présentent les meilleurs K_i (figure 12).

¹⁶ C. N. Carrigan, R. D. Bartlett, C. Sean Esslinger, K. A. Cybulski, P. Tongcharoensirikul, R. J. Bridges, C. M. Thompson, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2260-2276 ainsi que les publications citées.

¹⁷ Y. Shigeri, R. P. Seal, K. Shimamoto, *Brain research review*, **2004**, 45, 250-265 ainsi que les publications citées.

¹⁸ H. C. Winter, T. Udea, *Neuron. Res.*, **1993**, 18, 79-85.

¹⁹ C. N. Carrigan et al., *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2260-2276

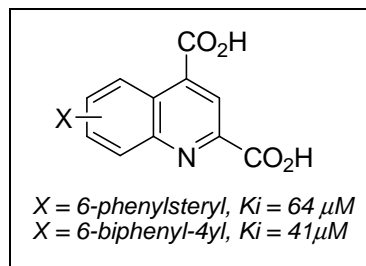


Figure 12 : valeurs de K_i de QDC substitués.

Actuellement comme pour les EAATs, le nombre d'inhibiteurs connus et sélectifs des VGluTs est insuffisant pour élucider le rôle spécifique de chacun de ces transporteurs dans le SNC.

I.2.2 Les récepteurs spécifiques du Glu

Comme nous l'avons précédemment évoqué, il existe deux sortes de récepteurs du Glu (GluRs) : les récepteurs ionotropiques (iGluR) qui sont principalement associés à des réponses synaptiques excitatrices rapides et les récepteurs métabotropiques (mGluR) qui ont des effets à plus long terme... Les GluRs jouent un rôle clé dans un certain nombre de processus fondamentaux qui incluent le développement neuronal, celui de l'apprentissage ou de la mémoire.

A. Les récepteurs ionotropiques (iGluR)

a) Description

Ce sont des récepteurs canaux transmembranaires et leur activation entraîne l'ouverture de canaux ioniques induisant des variations de concentration d'ions et créant aussi un courant dans la région post-synaptique des neurones. Ils sont perméables aux ions Na^+ , K^+ et certains aux cations Ca^{2+} .

Chez l'homme, les iGluR peuvent être regroupés en 4 familles selon leurs caractéristiques pharmacologiques portant ainsi le nom d'un de leur agoniste sélectif : **NMDA** (N-méthyl-D-Asp), **AMPA** (acide (S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionique) et **KA** (kainate). Les familles AMPA et KA, de part leurs propriétés pharmacologiques assez voisines, sont parfois regroupées sous le terme de récepteurs non-NMDA.

Il semblerait que les iGluRs correspondent à des assemblages tétramériques de différentes sous-unités (NR1-3, GluR1-7, KA1-2, figure13).

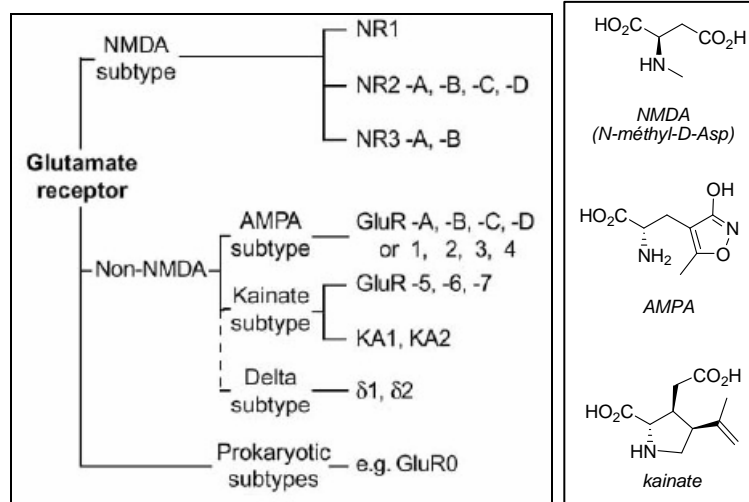


Figure 13 : les différentes familles d'iGluR.

Les sous-unités des iGluRs possèdent une structure de base commune qui peut être décomposée en 4 parties distinctes : un domaine N-terminal, un domaine de liaison des agonistes (sous-domaines S1 et S2), un domaine transmembranaire (constitué de 4 hélices), et un domaine carboxy-terminal intracellulaire (figure 14).

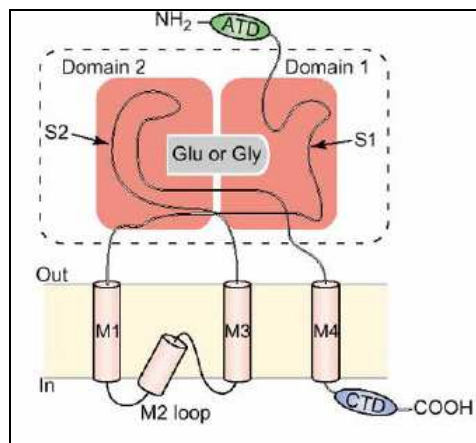


Figure 14 : structure commune aux sous-unités des iGluRs.

Le site de liaison du glutamate se présente comme une poche formée par l'apposition des domaines S1 et S2 dans laquelle les atomes chargés du glutamate forment des liaisons électrostatiques avec les acides aminés de la protéine. L'organisation des segments hydrophobes dans la membrane plasmique et la tétramérisation des sous-unités permet la formation d'un pore à travers lequel diffusent les ions.

En plus du site de fixation du Glu, il existe plusieurs sites de liaison d'agonistes et antagonistes non compétitifs du Glu notamment au niveau du domaine N terminal.

b) Les principaux ligands des iGluRs^{20,21,22}

L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes sélectifs des iGluRs permet de déterminer le rôle spécifique de chacun d'entre eux au niveau du SNC mais aussi d'envisager des applications thérapeutiques pour le traitement de maladies et de désordres mentaux.

L'inhibition des récepteurs iGluRs peut se faire de trois façons (figure 15). Dans le cas des antagonistes compétitifs, la fixation a lieu sur le site spécifique du Glu. Dans le cas des antagonistes non compétitifs, la fixation a lieu sur d'autres sites ou encore à l'intérieur des canaux ioniques bloquant ainsi le mouvement des cations à travers la membrane. De plus, il existe des composés qui interviennent sur des sites allostériques. Ces molécules peuvent avoir des effets qui amplifient (modulateurs positifs) ou qui diminuent (modulateurs négatifs) l'effet d'un ligand sur l'activité des récepteurs.

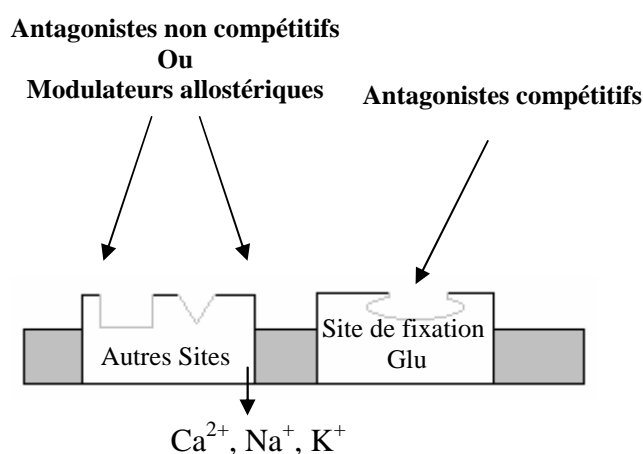


Figure 15 : les différents types d'inhibiteurs des iGluRs.

i) Les principaux ligands des NMDARS

L'activation des récepteurs NMDA (NMDARs) nécessite la fixation du Glu mais aussi celle de la Glycine en tant que co-agoniste. Ces récepteurs régulent le flux des cations Na^{+} et K^{+} ainsi que des Ca^{2+} . La surexcitation des NMDARs serait à l'origine ou tout au moins liée à diverses maladies et désordres mentaux (attaque cérébrale, maladies d'Huntington, Alzheimer, traumatismes ...). Il apparaît donc intéressant de développer des antagonistes sélectifs des NMDARs. De très nombreuses études ont été réalisées à cette fin.

❖ Les antagonistes compétitifs des NMDARs :

Des analogues du Glu possédant un phosphonate à la place du groupement carboxylate γ s'avèrent être des antagonistes compétitifs des NMDARs (figure 16). Cependant ces composés

²⁰ N. C. Kew, J. A. Kemp, *Psychopharmacology*, **2005**, 179, 4-29 et les références citées.

²¹ M. G. Moloney, *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, 19, 597-616 et les références citées.

²² H. Bräuner-Osborne, J. Egebjerg, E. Nielsen, U. Madsen, P. Krosgaard-Larsen, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 2609-2645.

montrent de faibles sélectivités vis-à-vis des différentes sous-unités des NMDARs et ont une activité médiocre *in vivo* car ils ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique.

Cependant, il existe quelques exceptions comme le composé **PEAQX** qui est le plus sélectif vis-à-vis des sous-unités NR1 et NR2A en restant actif *in vivo*. Nous pouvons de même citer **PPDA** qui est, quant à lui, sélectif des NR2C et NR2D.

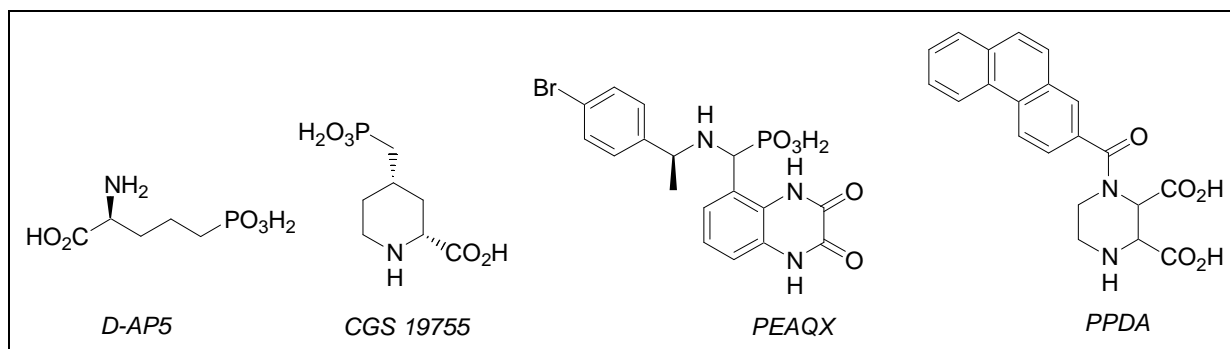


Figure 16 : antagonistes compétitifs des NMDARs.

Beaucoup d'antagonistes compétitifs ont montré lors d'essais cliniques de trop nombreux effets secondaires. Les recherches se sont alors orientées vers le développement d'antagonistes non compétitifs de structures beaucoup plus variables qui, se fixant sur des sites allostériques ou sur le site de fixation de la glycine, bloquent les récepteurs NMDA ou modulent leur activité avec de plus faibles effets secondaires.

❖ Les antagonistes non compétitifs des NMDARs :

Quelques exemples d'antagonistes non compétitifs sont décrits dans la figure ci-dessous.

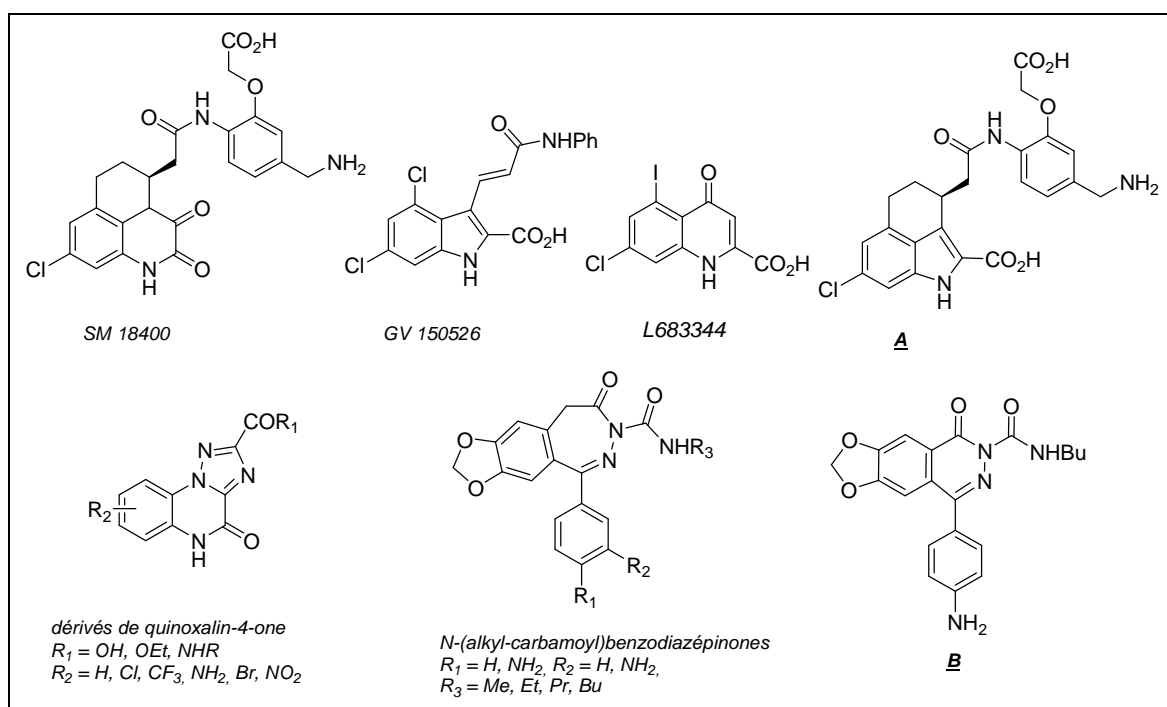


Figure 17 : quelques antagonistes non compétitifs des NMDARS.

Parmi les antagonistes du site de fixation de la glycine des NMDARs, on compte les quinoxalinediones comme le composé **SM18400**, les acides 2-carboxylindole comme **GV150526** et **A**, ainsi que des dérivés de l'acide kynurenique tel que **L683344**. Cependant, même si ces composés ont des effets antagonistes *in vivo*, leur propriété physico-chimique ne leur permet pas de franchir efficacement la barrière hémato-encéphalique.

Des dérivés de la quinoxalin-4-one ont aussi des effets antagonistes non compétitifs montrant qu'un cycle triazole peut mimer un des groupements carbonyles des quinoxalinediones. De nombreuses études se sont aussi centrées sur l'élaboration d'analogues de benzodiazépine et de phtalazine substituées comme le composé **B** qui possède des propriétés anti-convulsantes.

Des bloqueurs de canaux ioniques des NMDARs comme la phencyclidine **PCP** et la dizocilpine (**MK-801**), se sont avérés des antagonistes sélectifs des NMDARs et actifs *in vivo* (figure 18). D'autres molécules ont été identifiées mais un certain nombre d'entre elles présentent une trop grande affinité vis à vis des canaux ioniques en les bloquant de façon permanente. Ces composés génèrent alors des effets secondaires de nature psychotomimétique (qui induisent des changements de la perception, de la pensée et du jugement), ainsi que des dépressions respiratoires et des dérèglements cardiovasculaires. Cependant, des composés comme la **Mémantine** présentent de plus faible affinité et se montrent plus efficaces en assurant un blocage réversible des canaux ioniques. La Mémantine s'avère mieux tolérée par l'organisme et est actuellement utilisée pour le traitement symptomatique des derniers stades de la maladie d'Alzheimer.

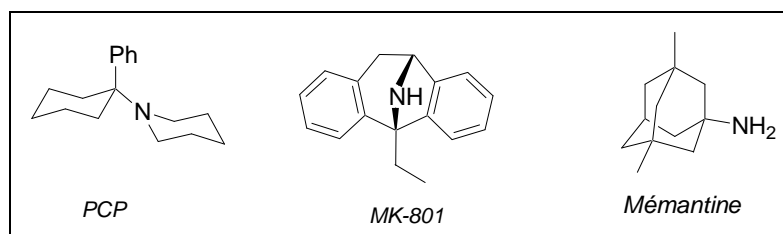


Figure 18 : exemples de bloqueurs de canaux ioniques des NMDARs.

Des polyamines endogènes (spermines, spermidine) ainsi que des amines plus simples comme l'**Eliprodil** se fixent sur les sites allostériques de reconnaissance des amines des NMDARs et suscitent un certain intérêt pour leurs effets antagonistes non compétitifs sur ces récepteurs (figure 19).

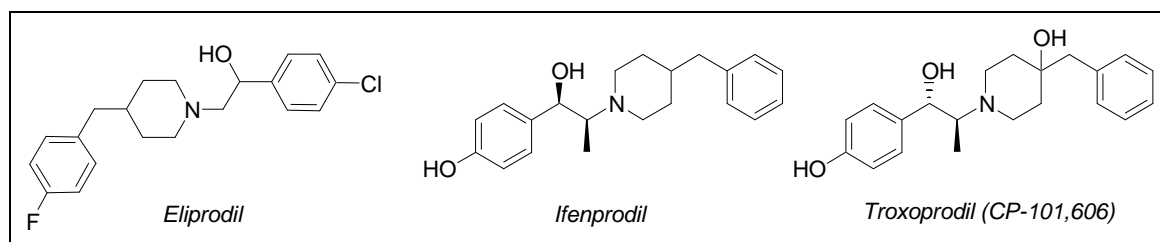


Figure 19 : exemples de modulateurs allostériques des NMDARs.

L'**Ifenprodil** est le premier antagoniste sélectif des sous unités NR2B à avoir été identifiés, et de nombreux dérivés comme le **Troxoprodil** ont été étudiés. Ce composé possède une importante sélectivité vis-à-vis des sous-unités NR2B et a été testé jusqu'en phase III des essais cliniques pour le traitement de divers traumatismes cérébraux. Les essais cliniques ont été interrompus car ce composé provoque des effets indésirables tels que des troubles de l'agitation, des hallucinations, des confusions et des vertiges.

ii) Les principaux ligands des récepteurs non NMDA ^{18,19, 23}

Par comparaison avec les NMDARs, la littérature psychopharmacologique relate un nombre moins important de molécules agissant sur les récepteurs non NMDA. Cela est apparemment dû à un manque d'outils pharmacologiques sélectifs vis-à-vis de ces récepteurs.

❖ Les antagonistes des récepteurs AMPA (AMPArs)

La série des quinoxalinediones (antagonistes compétitifs) permet de distinguer les récepteurs non NMDA des NMDARs. En effet, certains de ces dérivés, déjà évoqués à propos des NMDARs, s'avèrent être sélectifs des AMPARs. Nous pouvons ainsi citer l'exemple de **NBQX** qui présente d'importantes propriétés neuroprotectrices (figure 20). Cependant, la plupart de ces composés sont très peu solubles dans l'eau et sont toxiques pour les reins au niveau desquels ils précipitent.

Une seconde génération de composés plus hydrosolubles a été décrite. Parmi ces molécules, nous pouvons citer le composé **YM872** qui est actuellement entré en essais cliniques pour le traitement des ischémies (figure 20).

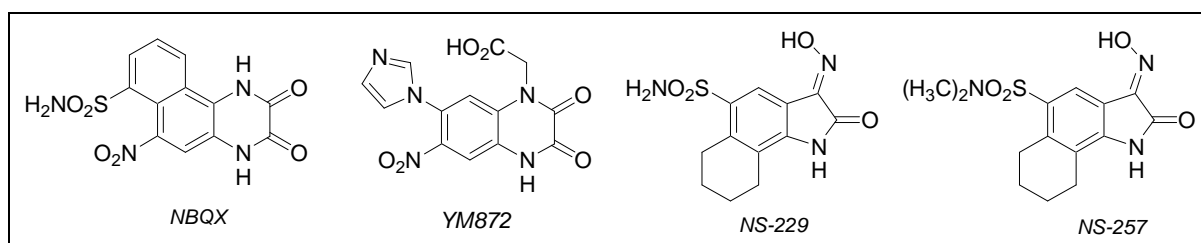


Figure 20 : dérivés de la quinoxalinedione, antagonistes compétitifs des non NMDARs.

D'autres structures proches de celles des quinoxalinediones comme les isatinoximes ont montré des effets inhibiteurs vis-à-vis des non NMDARs. Par exemple, la molécule **NS-229** est un antagoniste compétitif spécifique des KARs alors que son analogue **NS-257** montre les mêmes effets mais envers les AMPARs (figure 20).

²³ A. Chimiri, R. Gitto, M. Zappalà, *Exp. Opin. Ther. Patents*, **1999**, 9, 557-570.

D'autres classes de composés antagonistes compétitifs des AMPARs ont été étudiées mais leurs effets thérapeutiques restent, pour la plupart, limités par leurs caractéristiques physicochimiques et pharmacocinétiques (insolubilité, activité *in vivo* de courte durée).

Cependant, des antagonistes non compétitifs tels que les benzodiazépines et des dérivés substitués de la (2,3)-quinazoline peuvent être très intéressants car ils agissent sur les sites allostériques et ont des effets modulateurs même en présence d'une forte concentration en Glu. De plus, ces composés ont l'avantage d'être actifs *in vivo* après administration orale (figure 21).

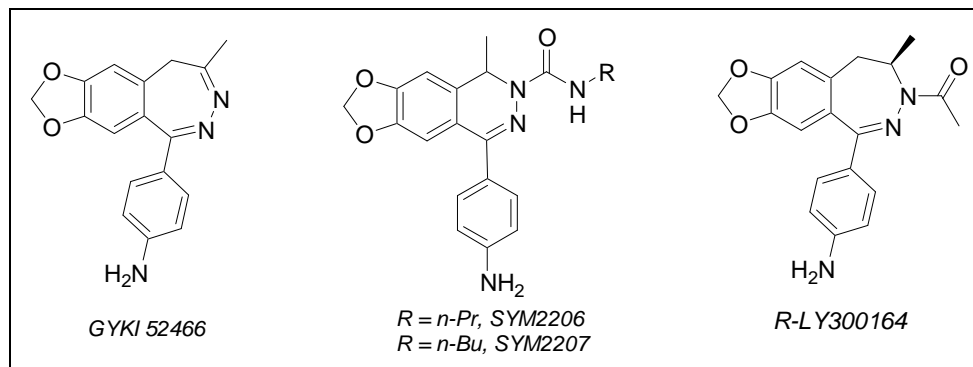


Figure 21 : exemples d'antagonistes non compétitifs des AMPARs.

Nous pouvons citer l'exemple de **GYKI 52466** qui est sélectif des AMPARs et montre des propriétés anti-convulsante et cerebroprotectrice. D'autres dérivés des benzodiazépines comme les **arylphtalazines** (**SYM 2206** et **SYM 2207**) ont aussi montré des effets sélectifs comparables. Enfin, nous pouvons donner l'exemple de la molécule **R-LY300164** qui est entrée en essais clinique pour le traitement de l'épilepsie.

Des modulateurs allostériques positifs ont aussi montré une activité dans divers essais comportementaux (mémoire, apprentissage). Nous pouvons prendre l'exemple des benzamides aussi connus sous le terme de « AMPAkines » tel que **CX516** et **CX546** (figure 22).

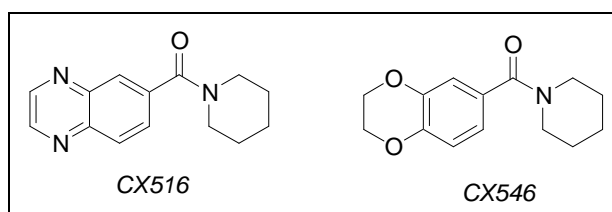


Figure 22 : exemple de modulateurs allostériques des AMPARs.

❖ Les antagonistes compétitifs et non compétitifs des KARs

Les agonistes tels que **ATPA**²⁴, **(S)-5-iodowillardiine**²⁵ et ses dérivés²⁶, l'analogue du Glu **4MG** (**SYM 2081**)²⁷ et **LY339434**²¹ montrent une forte affinité pour les sous unités GLUR5 et sont des sondes potentielles pour l'étude des fonctions physiologiques des récepteurs KA.

²⁴ K. Hoo, *Neuropharmacology*, 1999, 38, 1811-1817.

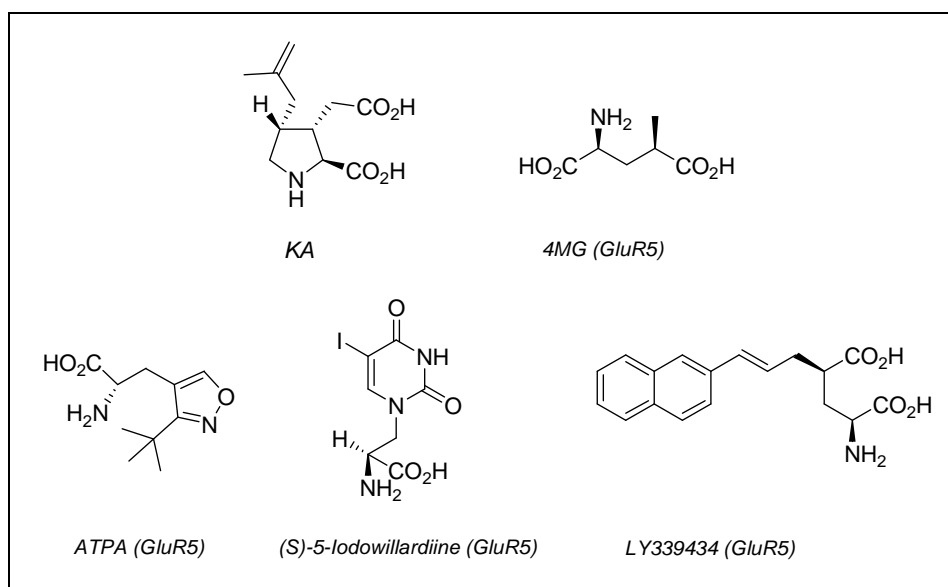


Figure 23 : exemples d'agonistes sélectifs des KARs.

Comme exemple d'antagonistes sélectifs des KARs, nous pouvons citer le composé **LY382884** qui présente des propriétés anxiolytiques^{28,29} (figure 24). Nous pouvons aussi citer **UBP 302**³⁰ qui est un inhibiteur sélectif des GluR5 et la molécule **NS 3763**³¹, un exemple de modulateur allostérique négatif qui agit sélectivement sur les GluR5 et les GluR6.

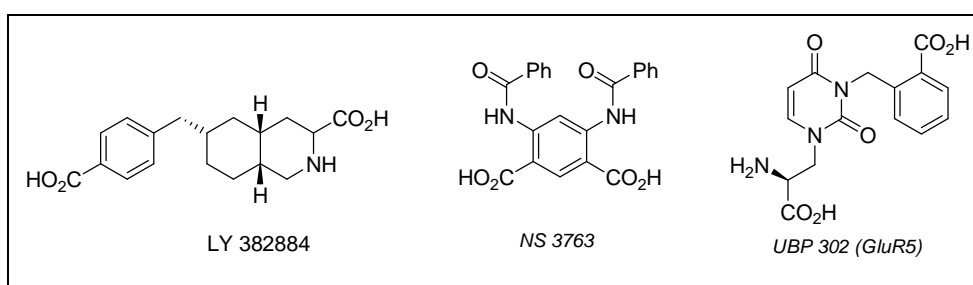


Figure 24 : exemples d'antagonistes non compétitifs sélectifs des KARs.

En résumé, un nombre important d'agonistes et antagonistes des KARs et plus particulièrement sélectifs des sous unités GLUR5, ont été identifiés. Il reste cependant de nombreux efforts à fournir pour le design et la synthèse de ligands sélectifs des autres sous unités des KARs. L'utilisation de ces ligands permettra d'élucider le rôle spécifique des KARs qui demeure mal connu.

²⁵ G.T. Swanson et al., *Mol. Pharmacol.* **1998**, 53, 942-949.

²⁶ D. E. Jane et al., *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1558-1570.

²⁷ L. M. Zhou, Z. Q. Gu, A. M. Costa, K. Yamada, P. E. Mansson, T. Giordano, P. Skolnick, K. A. Jones, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, 280, 422-7.

²⁸ Z. A. Bortolotto et al., *Nature*, **1999**, 402, 297-301.

²⁹ I. Smolder et al., *Nat. Neuro.*, **2002**, 8, 796-804.

³⁰ J. A. Slattery, A. J. Page, C. L. Dorian, S. M. Brierley, L. Blackshaw, *J. Phys.*, **2006**, 577, 295-306.

³¹ Christensen et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, 309, 1003.

B. Les récepteurs métabotropiques

a) Description

Les mGluRs sont des récepteurs qui font partie de la classe III de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces RCPGs sont des récepteurs membranaires heptahélices qui exercent la plupart de leurs effets cellulaires en stimulant une étape clé du cycle d'activation des GTPases hétérotrimériques (ou protéines G).

Le rôle des mGluRs est de réguler et de participer à la transmission synaptique par le biais de plusieurs effecteurs comme la protéine kinase C, les récepteurs à l'inositol ou des canaux ioniques membranaires. Les mGluRs sont classés en trois sous groupes en fonction de leur homologie de séquence ainsi que de leur pharmacologie (tableau 3).

mGluRs		
<i>Groupe I</i>	<i>Groupe II</i>	<i>Groupe III</i>
mGluR1a-d	mGluR2	mGluR4a-b
mGluR5a-b	mGluR3	mGluR6
		mGluR7a-b
		mGluR8a-b

Tableau 3 : les différents sous groupes des mGluRs

Le **groupe I** est composé des sous groupes mGluR1 et mGluR5, couplé positivement à la phospholipase C via des protéines G du type G_{γ} et se situe principalement dans les régions post-synaptiques. L'activation de la phospholipase C entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en inositol triphosphate et une mobilisation du calcium.

Le **groupe II** est composé des sous groupes mGluR2 et mGluR3, et le **groupe III** rassemble les sous groupes mGluR4 et mGluR6-8, qui inhibent l'adénylate cyclase via des protéines G du type G_i/G_o , ce qui entraîne une chute de la concentration cellulaire du messenger cAMP (Adénosine MonoPhosphate cyclique).

L'activation des mGluRs du groupe I est généralement associée à une exaltation des réponses synaptiques excitatrices alors que celle des groupes II et III est liée à un affaiblissement de la réponse synaptique via une inhibition de la libération du Glu.

La caractéristique structurale des mGluRs est la présence d'un site de fixation bilobé du ligand (appelé domaine « *Venus Flytrap* »³²) situé dans un large domaine N terminal extracellulaire qui est lié par un domaine riche en cystéines au domaine hépathélice (région transmembranaire formée de 7 hélices, Figure 25).

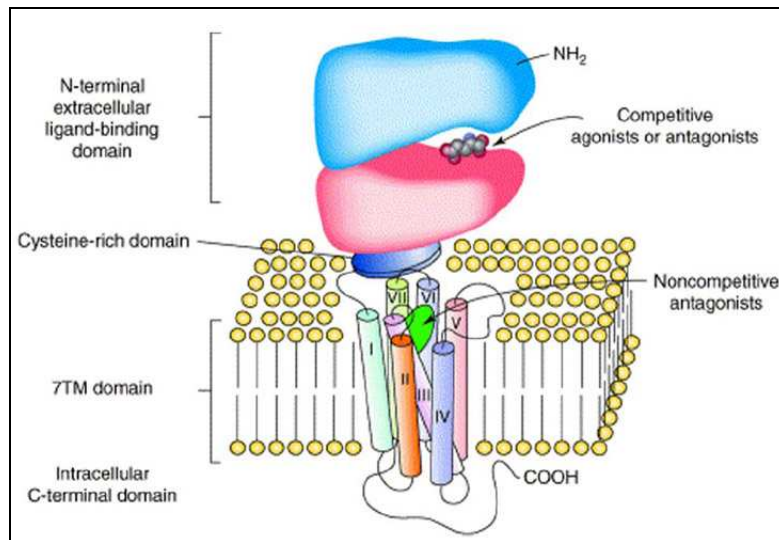


Figure 25 : structure des mGluRs³³.

La fixation du Glu entraîne des modifications structurales (conformation fermée) qui produisent l'activation de la protéine G en interaction avec les boucles intracellulaires du récepteur.

D'après des études récentes, il semblerait que les mGluRs forment des homodimères. Dans le cas des mGluR1³⁴, la dimérisation amplifierait le changement conformationnel lors du passage à la forme fermée, ce qui serait responsable de l'activation des protéines G (figure 26).

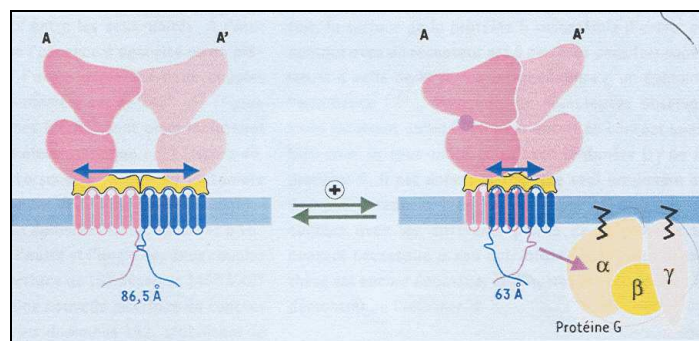


Figure 26 : mGluRs sous la forme d'homodimères : amplification de l'activation des protéines G³¹.

Les antagonistes sélectifs du Glu se lient au domaine « *Venus Flytrap* » et empêchent le site de fixation d'adopter une conformation fermée. Comme pour les iGluRs, il existe aussi des sites de fixation pour des effecteurs non compétitifs et des modulateurs allostériques. Ces sites se situent au niveau du domaine transmembranaire du récepteur.

³² T. Galvez, J. P. Pin, *M/S*, **2003**, 19, 559-565.

³³ Extrait de « La distribution subcellulaire des récepteurs du glutamate de type Kainate » de F. Jaskoski, disponible en ligne sur www.123bio.net.

³⁴ N. Kunishima, Y. Shimada, Y. Tsuji, et al., *Nature*, **2000**, 407, 971-977.

b) Les principaux ligands des mGluRs^{18, 19, 35}

Des molécules agissant spécifiquement sur les mGluRs présentent un intérêt thérapeutique pour le traitement de la douleur, de l'anxiété ou de la dépendance à certaines drogues. Par ailleurs, nous avons vu que les antagonistes des iGluRs ont montré d'importants effets secondaires lors d'essais précliniques et l'une des solutions serait de moduler plus finement la réponse du système glutamatergique en utilisant des substances actives au niveau des mGluRs.

❖ Les ligands compétitifs des mGluRs

La figure 27 décrit quelques exemples de molécules ayant des effets sélectifs sur les récepteurs métabotropiques du Glu.

Tous les mGluRs sont activés par l'ACPD qui montre des effets anti-convulsants.

Les récepteurs du groupe I sont activés par les molécules du type **QUIS** et **DHPG**. Actuellement, aucune molécule n'a été décrite comme agoniste sélectif des mGluR1 vs mGluR5. Cependant, des dérivés de la carboxyphénylglycine tels que **LY367385** et **AIDA** ont été identifiés comme étant des antagonistes sélectifs des mGluR1. Mais en général, le profil pharmacocinétique des antagonistes compétitifs des mGluRs du groupe I a réduit leur utilité *in vivo* car ils ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique.

Les récepteurs du groupe II sont sélectivement activés par des molécules contraintes comme l'**APDC** ou comportant des cyclobutanes et cyclopropanes comme **CCG-1** et **DCG-IV** qui a suscité de nombreuses études. Les agonistes sélectifs des mGluR II sont apparus efficaces dans divers modèles pour le traitement de l'anxiété sans manifester d'effets secondaires. De plus, leur utilisation pourrait diminuer les effets secondaires des agents psychomimétiques tel que le PCP (bloqueur des canaux ioniques sélectifs des NMDARs) et des amphétamines. Le neuropeptide endogène N-acétylaspartylglutamate (**NAAG**) est le seul composé décrit comme étant un agoniste sélectif des mGluR3 vs mGluR2.

Le composé **LY354740** et ses dérivés constituent de bons exemples d'agonistes des mGluR II puisqu'ils sont en essais cliniques pour le traitement de l'anxiété avec des résultats thérapeutiques prometteurs.

³⁵ Z. G. Gao, K. A. Jacobson, *DDT*, **2006**, *11*, 191-202.

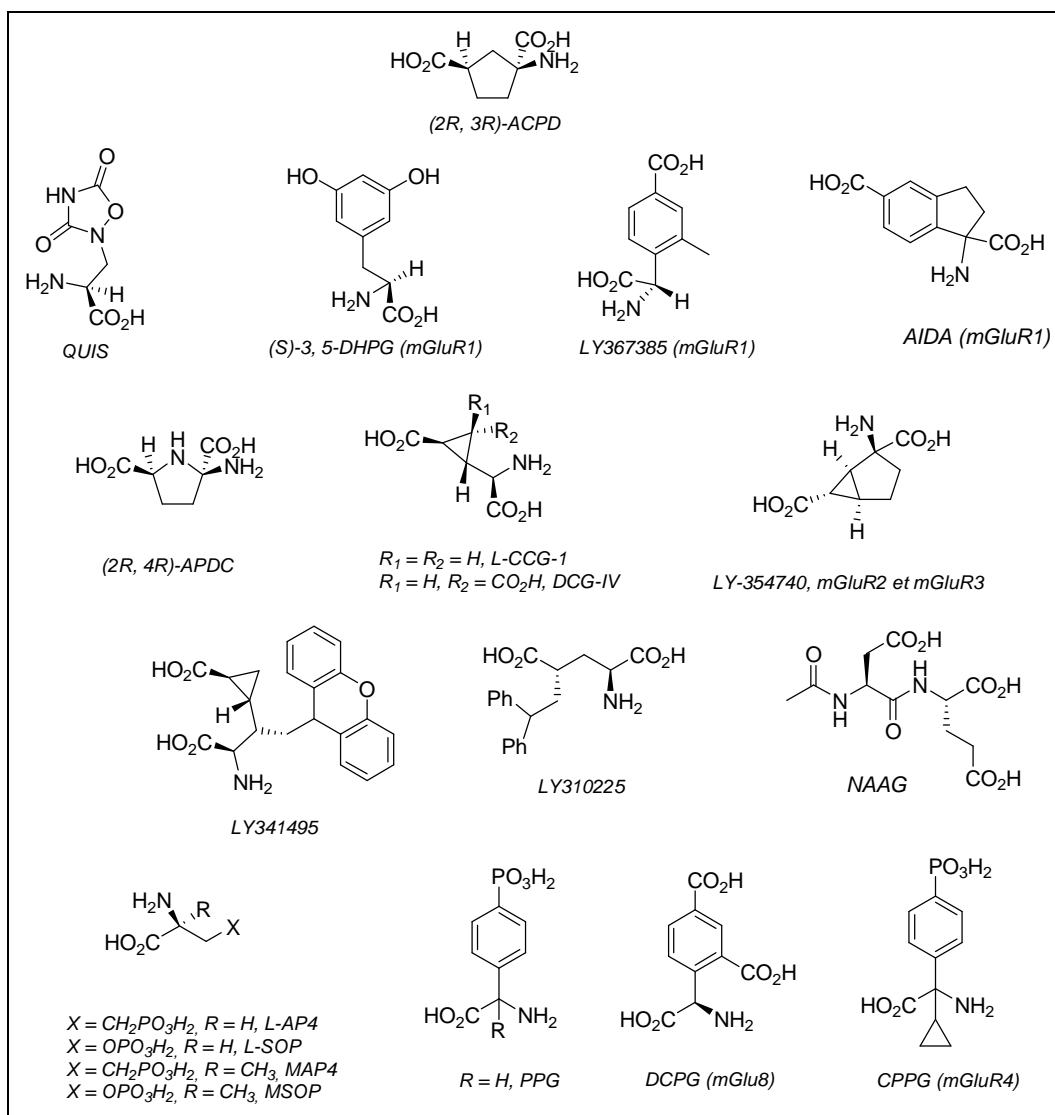


Figure 27 : agonistes et antagonistes compétitifs et sélectifs des mGluRs.

D'autres analogues du Glu tels que **LY341495** et **LY310225** sont décrits comme des antagonistes sélectifs des mGluRs II qui ont l'avantage de franchir facilement la barrière hémato-encéphalique. Cependant, l'intérêt thérapeutique de ces molécules n'a pas été rapporté à ce jour.

Les récepteurs du groupe III sont plus sensibles aux composés phosphorés comme l'**AP4** où le groupement phosphonate mime le carboxylate γ du Glu. L'AP4, tout comme ses analogues, interagit de la même façon que le Glu au niveau du domaine *Venus Flytrap* et active ainsi plus sélectivement les mGluR4, 6 et 8 du groupe III. Le sous groupe mGluR7, quant à lui, se différencie plus facilement des autres sous groupes des mGluR III car il montre une très faible affinité vis-à-vis des analogues du Glu. Une série de dérivés de la phénylglycine substitués a aussi été étudiée. Le **PPG** et le **DCPG** activent préférentiellement les mGluR8.

De nombreux antagonistes compétitifs des mGluR III ont été identifiés mais leur caractérisation pharmacologique reste incomplète. Nous pouvons citer un des dérivés de la

phenylglycine **CPPG** comme exemple d'antagoniste compétitifs des mGluR III dont la sélectivité est plus orientée vers les mGluR4.

Comme nous avons pu le constater, de nombreuses molécules antagonistes ou agonistes compétitifs des mGluRs sont des analogues plus ou moins proches du Glu. Cependant, de nombreux travaux se sont orientés vers l'élaboration de nouvelles molécules dont les structures sont totalement différentes de celle du Glu et qui ont des effets sur les récepteurs mGluRs. Comme pour les iGluRs, il s'agit de ligands non compétitifs et de modulateurs allostériques qui se fixent au niveau du domaine transmembranaire (7DM, figure 25).

❖ Les ligands non compétitifs des mGluRs

Les premiers antagonistes non compétitifs identifiés des mGluRs ont été l'acide 7-hydroxyiminocyclopropan[β]chromene (**CPCCOEt**) et le 2-méthyl-6-(phényléthynyl)-pyridine (**MPEP**) qui sont respectivement des modulateurs négatifs sélectifs des mGluR1 et mGluR5 (figure 28). Cependant, le MPEP a aussi montré une activité vis-à-vis des transporteurs de la noradrénaline. Un de ses analogues, le **MTEP**, présente une meilleure sélectivité vis-à-vis des mGluR5 et est actif après administration orale.

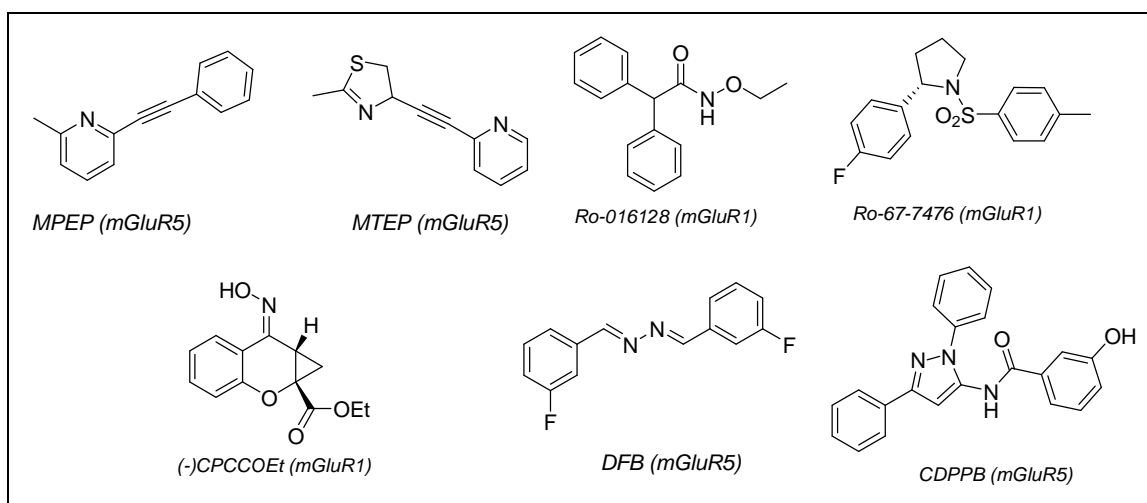


Figure 28 : les principaux modulateurs allostériques des mGluRs du groupe I.

Les antagonistes non compétitifs des mGluR5 sont décrits comme ayant une activité thérapeutique dans des modèles animaux présentant des désordres neurologiques et psychiatriques et plus particulièrement des troubles liés à l'anxiété ou à la dépendance à certaines drogues.

De plus, le développement de modulateurs allostériques des mGluRs présente un grand intérêt car ils permettent de moduler l'action des agonistes ou antagonistes compétitifs des mGluRs. Ils peuvent également améliorer la fixation des ligands compétitifs sur le site de fixation du Glu (figure 29).

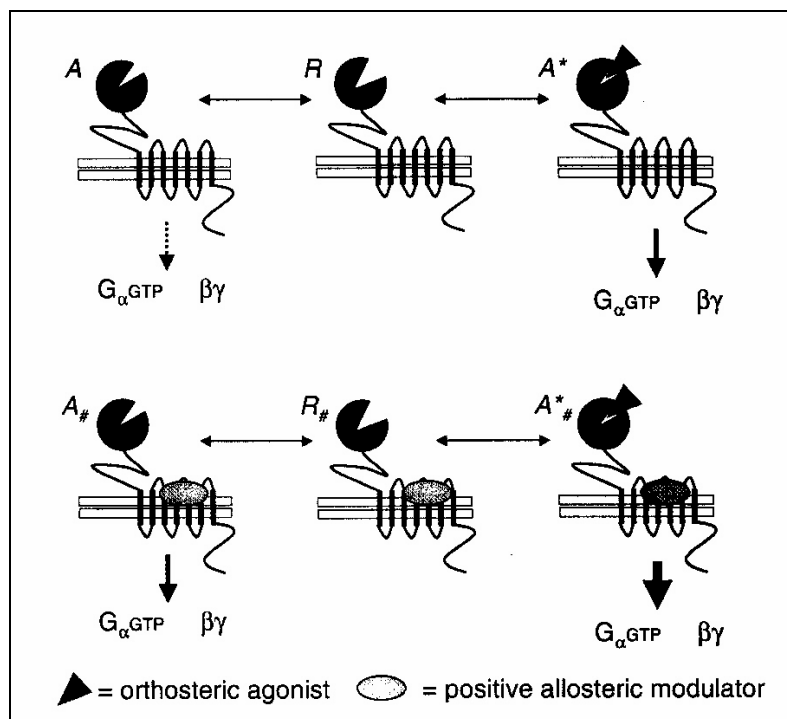


Figure 29 : effet des modulateurs allostériques sur les mGluRs.

Nous pouvons citer l'exemple de **Ro 67-7476** et **Ro 01-6128** qui sont des modulateurs positifs sélectifs des mGluR1 et qui permettent d'améliorer la fixation du [³H]-quisqualate, agoniste sélectif du Glu.

Le 3,3'-difluorobenzaldazine (**DFB**) est le premier composé à montrer des effets allostériques positifs vis-à-vis des mGluR5. Il est intéressant de mentionner que la substitution des groupements fluorés par des OMe ou des chlores induisent des effets négatifs et sélectifs vis à vis des mGluR5.

Une autre classe de modulateurs positifs et sélectifs des mGluR5 a été développée. La molécule **CDPPB** en est un exemple. Cette molécule montre des effets antipsychotiques et pourrait être utile dans le traitement de désordres mentaux.

Il est également intéressant de savoir que l'hypofonctionnement des NMDARs est impliqué dans la pathophysiologie de la schizophrénie. Il a été prouvé que la modulation positive des mGluR5 peut réactiver les NMDARs défaillants. Les modulateurs allostériques positifs sélectifs des mGluR5 peuvent alors avoir des applications thérapeutiques pour le traitement de la schizophrénie.

Les modulateurs des mGluRs du groupe II, le composé **LY-181837** est le premier à avoir été identifié comme ayant des effets allostériques positifs sélectifs des mGluR2 (figure 30). D'autres composés tel que **LY-487379** ont été identifiés plus tard comme étant des modulateurs sélectifs des mGluR2. De même, des composés indoliques comme la molécule **C** agissent sélectivement sur les mGluR2 et pourraient être utiles pour le traitement de la schizophrénie.

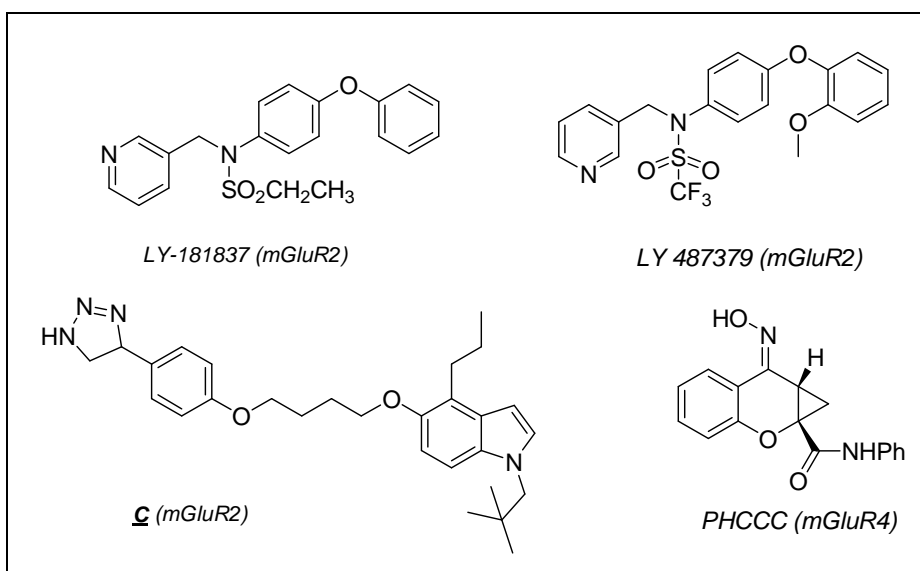


Figure 30 : ligands non compétitifs des mGluRs des groupes II et III.

Quant aux mGluRs du groupe III, seul l'analogue de CPCOEt appelé **PHCCC** a été identifié comme étant un agoniste non compétitif sélectif des mGluR4 (figure 30). Pourtant, la modulation positive des mGluR4 semble être une stratégie thérapeutique pour la maladie de Parkinson. De plus, à notre connaissance, aucun antagoniste non compétitif sélectif du groupe III n'a été décrit à ce jour.

Aujourd'hui, la modulation sélective des récepteurs du Glu par des molécules de structures diverses et variées, semble la stratégie thérapeutique la plus étudiée car elle laisse prévoir un minimum d'effets secondaires. Ainsi la recherche pharmaceutique s'oriente de plus en plus vers des ligands non compétitifs qui présentent une sélectivité d'action et une biodisponibilité supérieures à celles des ligands compétitifs du Glu.

Cependant, l'élaboration de nouveaux analogues du Glu suscitent toujours l'intérêt des chercheurs pour améliorer la compréhension du SNC qui reste aujourd'hui une partie mystérieuse du corps humain : comme nous l'avons évoqué dans plusieurs parties, le rôle de certains types de transporteurs ou de récepteurs ainsi que leur implication dans le SNC restent encore à élucider... Rappelons par ailleurs que les analogues contraints du Glu similaires à **LY354740** couvent un fort potentiel thérapeutique pour le traitement de l'anxiété.

Chapitre II Les principales méthodes de synthèse d'analogues du Glu

Ce chapitre a pour but de donner un aperçu des principales méthodes de synthèse permettant la préparation stéréosélective d'analogues du Glu substitués en position 3 et 4. Quatre voies de synthèse principales s'en dégagent (schéma 2).

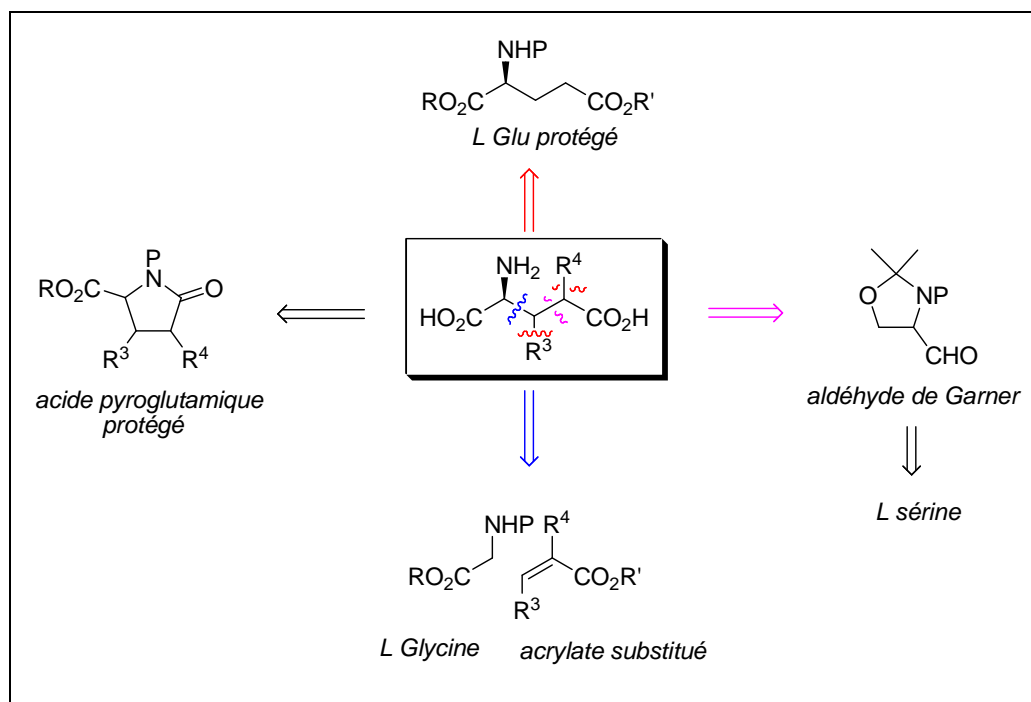


Schéma 2 : principales voies d'accès aux analogues du de Glu substitué en 3 et/ou 4.

L'alkylation directe du L-Glu ou de son analogue cyclique, l'acide pyroglutamique (pGlu), est une première méthode qui, dans la plupart des cas, montre une bonne diastéréosélectivité mais qui demande plusieurs étapes supplémentaires pour la protection de la molécule. La création des liaisons C^2-C^3 ou C^3-C^4 est une alternative intéressante qui a fait l'objet de nombreux travaux.

II.1 Synthèse à partir du L-Glu

En 1993, Paz et al.³⁶ ont effectué la synthèse du 3-méthylGlu en introduisant un groupement méthyle en position 3 par addition de Michael du diméthyl cuprate de lithium sur le dérivé (3,4)-didéshydro-Glu préparé au préalable à partir du Glu. Cette réaction n'est pas diastéréosélective mais offre l'avantage d'une séparation facile des deux diastéréoisomères car seul l'isomère *érythro* cyclise (schéma 3).

³⁶ M.M. Paz, F.J. Sardina, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6990-6995.

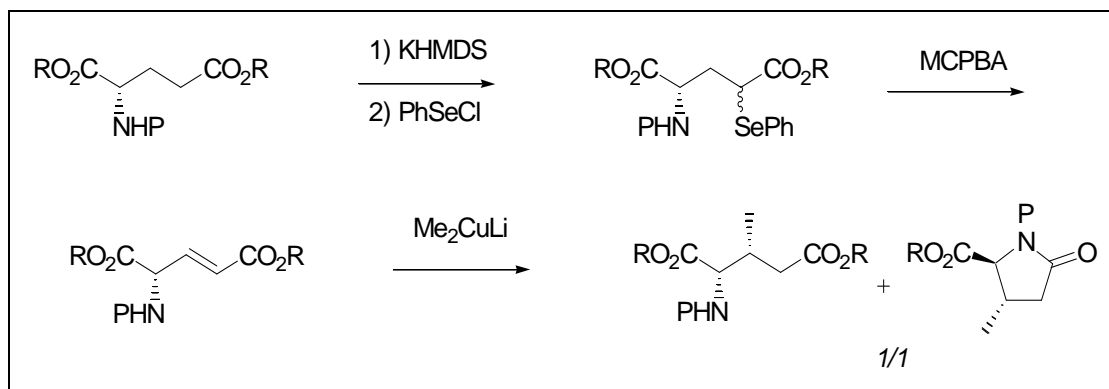


Schéma 3 : synthèse du 3-méthyl-Glu à partir du Glu.

Les exemples d'alkylation directe sur la position 4 du Glu sont nombreux. Si la protection des deux groupements carboxylate et de l'amine est judicieuse, alors l'alkylation, en plus d'être régiosélective, est stéréosélective (Tableau 4).

$\text{R}^1\text{O}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NHP})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{R}^2 \xrightarrow[\text{électrophile}]{\text{Base}} \text{R}^1\text{O}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NHP})-\text{CH}(\text{R}^4)-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{R}^2$							
P	R ¹	R ²	Base	électrophiles	Rendements (%)	Stéréosélectivité syn/anti ratio.	Ref
Pf	tBu	Me	KHMDS	BrCH ₂ CN	43	7/17	Koskinen et al. ³⁷
<i>p</i>-nitrobenzoyl	Et Me	Et Me	LiHMDS	Halogénure d'alkyles et allyliques	49-65	0/100	Gu et al. ³⁸
Cbz BOC	Me	Me	LiHMDS	BnBr	77 75	1/99	Hanessian et al. ³⁹

Tableau 4 : alkylation du Glu protégé.

Pour éviter une épimérisation du C² en présence d'une base forte, l'amine doit être préférentiellement protégée par des groupements encombrants tels que le 9-phénylfluorényle (Pf), le *p*-nitrobenzoyl ou un carbamate comme Cbz qui augmente l'acidité du NH. De même, le groupement carboxylate γ du Glu a été protégé par des groupements méthyliques, éthyliques ou *tert*-butylique (tBu).

Le choix de la base est tout aussi important pour assurer la stéréosélectivité de l'alkylation. Une base non nucléophile, plus encombrée et moins forte que le LDA comme les bases conjuguées de l'héxaméthylidisilazane KHMDS ou LHMDS, semble préférable.

³⁷ A. M. P. Koskinen, H. Rapoport, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 1859.

³⁸ Z. Q. Gu, D. P. Hesson, *tetrahedron : asymmetry*, **1995**, 6, 2101.

³⁹ S. Hanessian, R. Margarita, *tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 5887-5890.

L'isopropylcyclohexylamidure de lithium (LICA) a également été utilisée dans des réactions d'aldolisation pour former des 4-hydroxyalkyl-Glu⁴⁰ (Schéma 4). Cependant la diastéréosélectivité de cette réaction est faible.

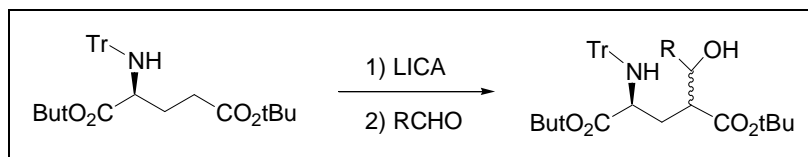


Schéma 4 : synthèse d'analogues des 4- hydroxyl-Glu.

L'obtention directe d'analogues du Glu substitués en 4 par un groupement polaire tel qu'un hydroxyle ou un halogène, est plus rare. Krasnov et al.⁴¹ ont synthétisé le 4-bromo-Glu directement à partir du Glu en présence de Br₂/PBr₅ sous irradiation (schéma 5). Les dérivés 4-iodo et 4-hydroxy-Glu ont ensuite été synthétisés par substitution nucléophile à partir du 4-bromo-Glu protégé. La fragilité des dérivés halogénés qui s'épimérisent aisément dans les solvants utilisés, ne permet pas de déterminer précisément le rapport *syn/anti*. Cependant, il semble que l'isomère *anti* soit majoritaire.

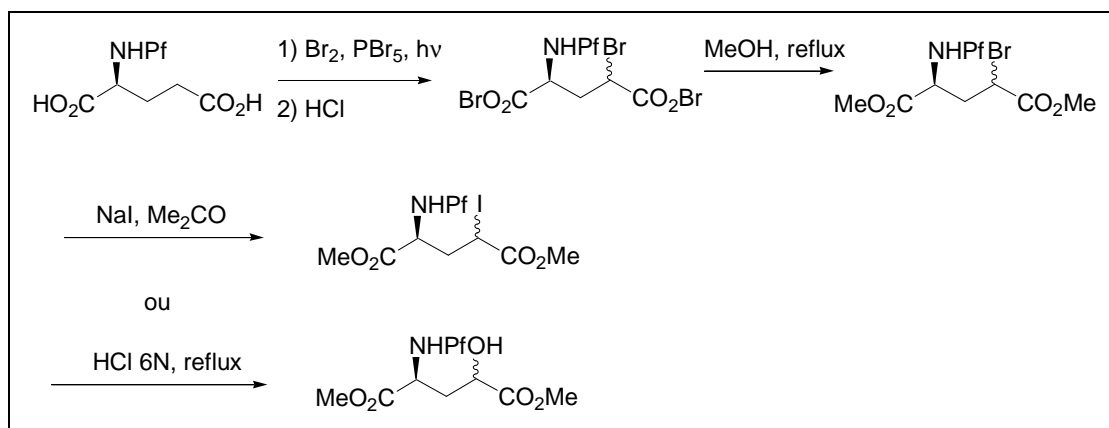


Schéma 5 : synthèse des 4-bromo, iodo et hydroxy-Glu.

Le (2*S*,4*R*)-4-hydroxy-Glu a également été obtenu majoritairement par oxydation du Glu protégé en utilisant le réactif de Davis (3-Phényl-N-phénylsulfonyloxaziridine)⁴² comme la figure ci-après le montre.

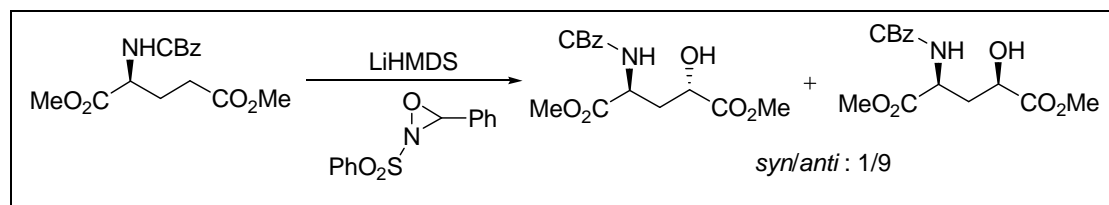


Schéma 6 : synthèse du 4-hydroxy-Glu par oxydation du Glu protégé.

⁴⁰ J. E. Baldwin, M. North, A. Flinn, M. G. Moloney, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 1453.

⁴¹ V. P. Krasnov, I. M. Bukrina, E. A. Zhdanova, M. I. Kodess, M. A. Korolyova, *Synthesis*, **1994**, 961.

⁴² S. Hanessian, B. Vanasse, *Can. J. Chem.*, **1993**, 71, 1401.

La diméthylation du Glu a été envisagée mais ne s'avère être possible qu'en enchainant les réactions d'alkylation une par une à partir de réactifs isolés et purifiés, et en protégeant le groupement carboxylate γ par un ester allylique⁴³.

En conclusion, nous retiendrons que l'alkylation direct du Glu par des halogénures primaires et de préférences activés (halogénures allyliques, benzyliques, propargyliques) présente de bons rendements et une bonne diastéréosélectivité en faveur de l'isomère L-(2,4)-*anti*.

II.2 Alkylation de l'acide pyroglutamique (pGlu)

Le L-Glu est facilement obtenu après hydrolyse acide ou basique de son analogue cyclique pGlu. Il est donc envisageable d'alkyler en position 3 ou/et 4 le pGlu protégé avant de l'hydrolyser (Schéma 7).

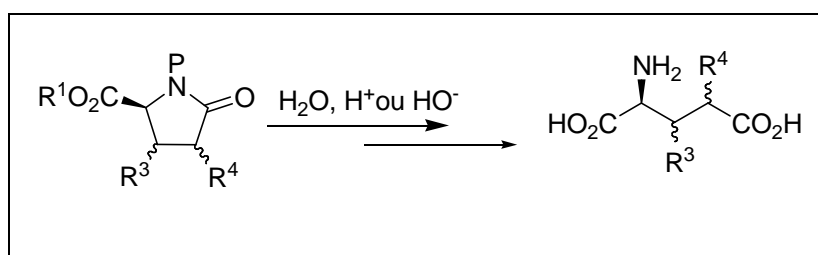


Schéma 7 : hydrolyse acide ou basique du pGlu.

La nature des groupements protecteurs de l'amine et plus particulièrement du groupement carboxylate, sont primordiaux pour conserver le caractère régio et stéréosélectif de l'alkylation.

Yanagida et al.⁴⁴ ont synthétisé le (2*S*,3*R*)-3-*para*-chlorophényl-Glu, précurseur du [®]Baclofen (dérivé du GABA), par addition de Michael d'un organocuprate sur le dérivé 3,4-didéhydro du pyroglutaminol (schéma 8). Dans ce cas, le carboxylate a été transformé en éther silylé tandis que l'amide est protégée par un BOC. Il faut cependant plusieurs étapes avant d'obtenir le dérivé insaturé du pyroglutaminol protégée (protection/séleniation/oxydation /élimination).

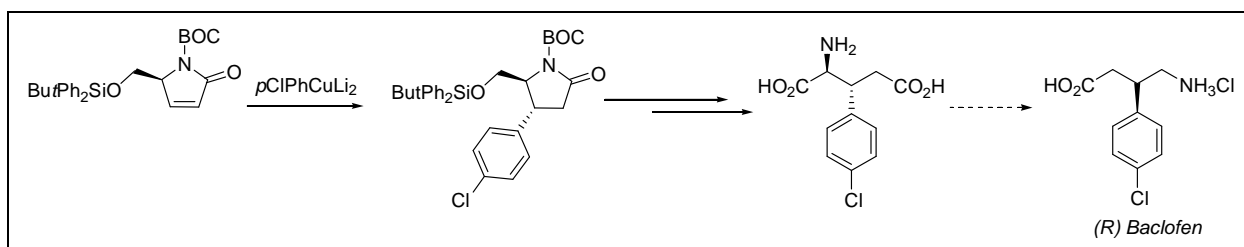


Schéma 8 : exemple de synthèse d'analogue du Glu substitué en 3 à partir d'un dérivé de pGlu.

Plus récemment, la même stratégie a été adoptée pour synthétiser le (2*S*,3*R*) et le (2*S*,3*S*)-3-méthylGlu à partir du même dérivé du pyroglutaminol. La méthylation utilisant le cuprate de

⁴³ V. Baversias et al., *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 1495.

⁴⁴ M. Yamada, K. Hashimoto, M. Ishida, H. Shinozaki, H. Shirahama, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 3799.

diméthyle donne exclusivement l'isomère *trans*. D'autre part, la formation diastéréosélective de la pyrazoline par cycloaddition de diazométhane sur le pyroglutaminol insaturé a permis de former, après thermolyse et hydrogénation catalytique, l'isomère *cis* du 3-méthyl-pGlu⁴⁵ (schéma 9).

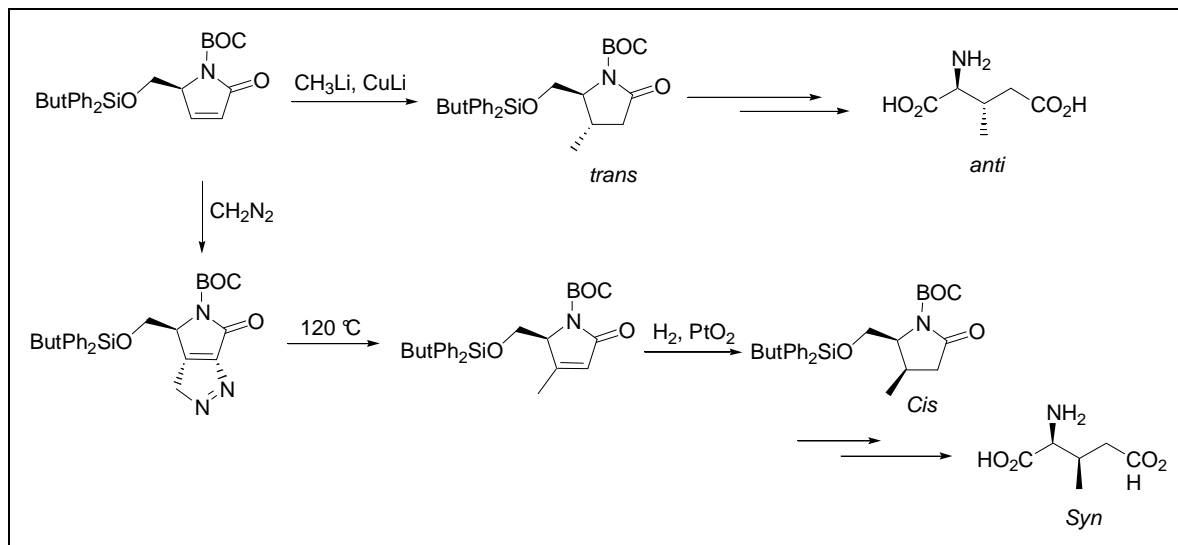


Schéma 9 : synthèse du (2*S*,3*R*) et (2*S*,3*S*)-3-méthylGlu.

La cyclopropanation⁴⁶ pallado catalysée mettant en jeu le diazométhane et la photocycloaddition⁴⁷ sur le dérivé insaturé du pyroglutaminol ont également permis la préparation d'analogues du Glu contraints comme L-CCG III, L-CBG I et III (Schéma 10).

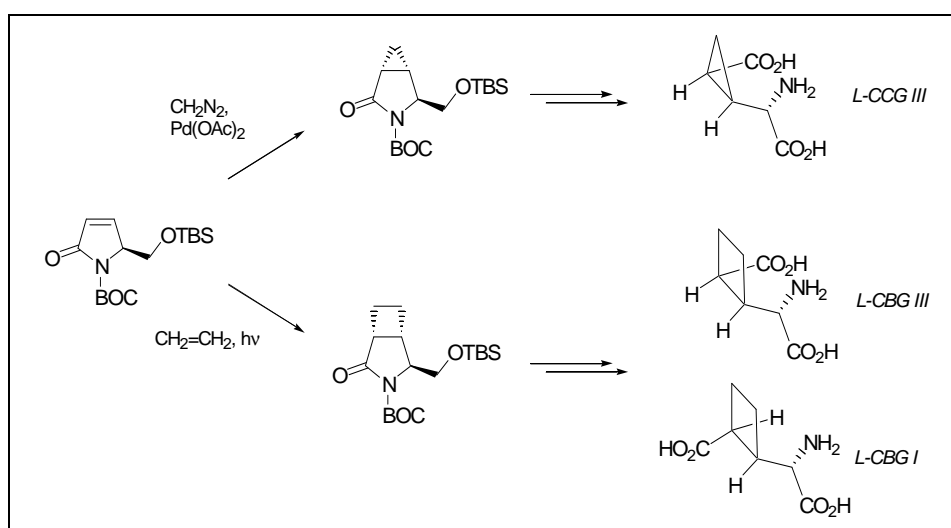


Schéma 10 : Formation d'analogues contraints du Glu.

Dans le cas du Glu, l'alkylation ou l'aldolisation en 4 du pGlu protégé peut se faire directement en présence d'une base forte comme LDA ou LiHMDS. L'amide du pGlu a été généralement protégée par un BOC. Le carboxylate peut être réduit en alcool et protégé par un groupement silylé encombrant favorisant la régiosélectivité et la stéréosélectivité de l'alkylation (tableau 5). Bleakman et al. ainsi que Hokelek et al., ont préféré protéger l'acide carboxylique du

⁴⁵ C. Milne, A. Pwell, J. Jim, M. Al Nakeeb, C. P. Smith, J. Micklefield, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 11250-11259.

⁴⁶ K. Shimamoto, I. Michiko, H. Shinozaki, Y. Ohfune, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4167-4176.

⁴⁷ H. Tsujishima, K. Nakatani, K. Shimamoto, Y. Shigeri, N. Yumoto, Y. Ohfune, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1193-1196.

pGlu sous la forme d'un ester méthylique, benzylique ou *tert*-butylique. La présence de ces groupements favorise la substitution en 4 sur la face la moins encombrée. Ainsi, le dérivé *trans*-pGlu est obtenu majoritairement et donne après hydrolyse l'analogue du Glu de configuration relative L-(2,4)-*syn* (Tableau 5). Notons par ailleurs que, comme pour l'alkylation directe du Glu, seuls des électrophiles activés ont été utilisés.

R	Base	électrophiles	Réf
CH ₂ OTBS	LDA	BnBr	Hon et al. ⁴⁸
CO ₂ Bn	LiHMDS	H ₂ C=CHCH ₂ Br	Bleakman et al. ⁴⁹
CO ₂ tBu	LiHMDS	PhCHO	Hokelek et al. ⁵⁰

Tableau 5 : alkylation du pGlu protégé.

Le dérivé 4-méthylène de conformation *trans* a été préparé de façon stéréosélective via un précurseur insaturé obtenue par réaction de mannich ou à partir d'une énamine préparée en utilisant le réactif de Bredereck. Ainsi, l'hydrogénation catalytique de l'énamine^{51,52} a permis d'obtenir le dérivé cyclique de configuration relative *cis* majoritaire qui conduit à l'analogue de Glu L-(2,4)-*trans* (Schéma 11). De plus, une épimérisation du 4-méthyl-pGlu en présence de KCN a permis d'accéder (après purification par chromatographie) à l'isomère *syn* du L-4-méthyl-Glu⁵³.

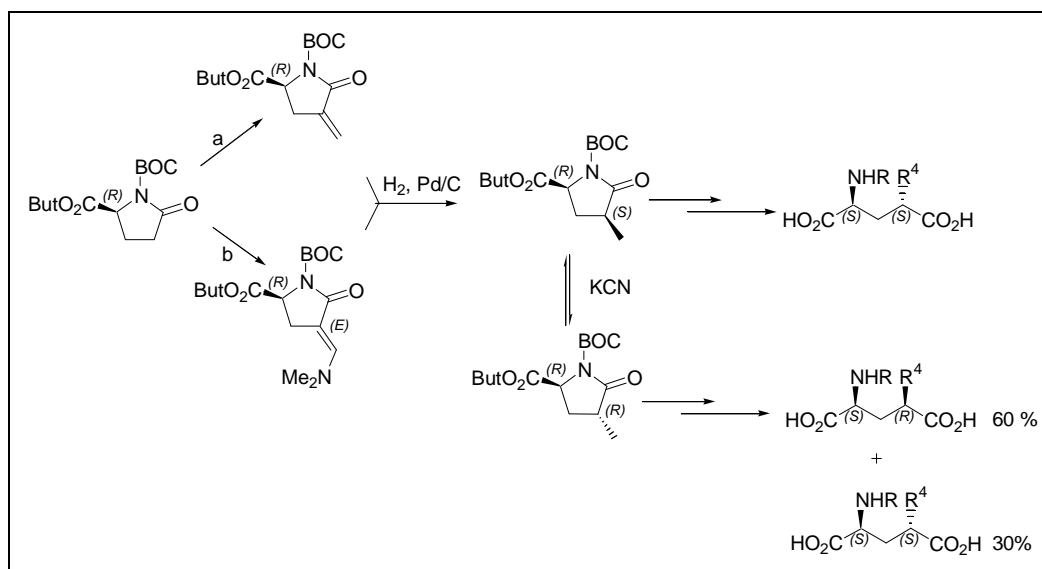


Schéma 11 : Synthèse du L-4-Me-Glu. Conditions a : 1) CH₂O, BF₃OEt₂ 2) MsCl ou 1) (H₂C=NMe₂)I, 2) MeI, NaHCO₃, conditions b : (Me₂N)₂CHOtBu.

⁴⁸ Y. S. Hon, Y. C. Chang, M. L. Cong, *Heterocycles*, **1990**, 31, 191.

⁴⁹ D. Bleakman, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 1958-1968.

⁵⁰ J. E. Baldwin, T. Miranda, M. Moloney, T. Hokelek, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 7459.

⁵¹ J. Ezquerro, C. Pedregal, A. Yrretagoyena, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2925.

⁵² C. Pedregal, J. Ezquerro, *Tetrahedron : Asymmetry*, **1994**, 5, 921.

⁵³ E. Coudert, F. Acher, R. Azerad, *Synthesis*, **1997**, 863.

Afin de contourner la difficulté de l'alkylation directe par des halogènes non activés, Escribano et al.⁵⁴ ont développé la même approche en préparant une série de 3-alkylidene-pGlu par déshydratation des produit d'aldolisation. Ils ont ainsi une variété d'analogues du Glu substitués en 4 et de configuration L-(2,4)-*anti* (Schéma 12).

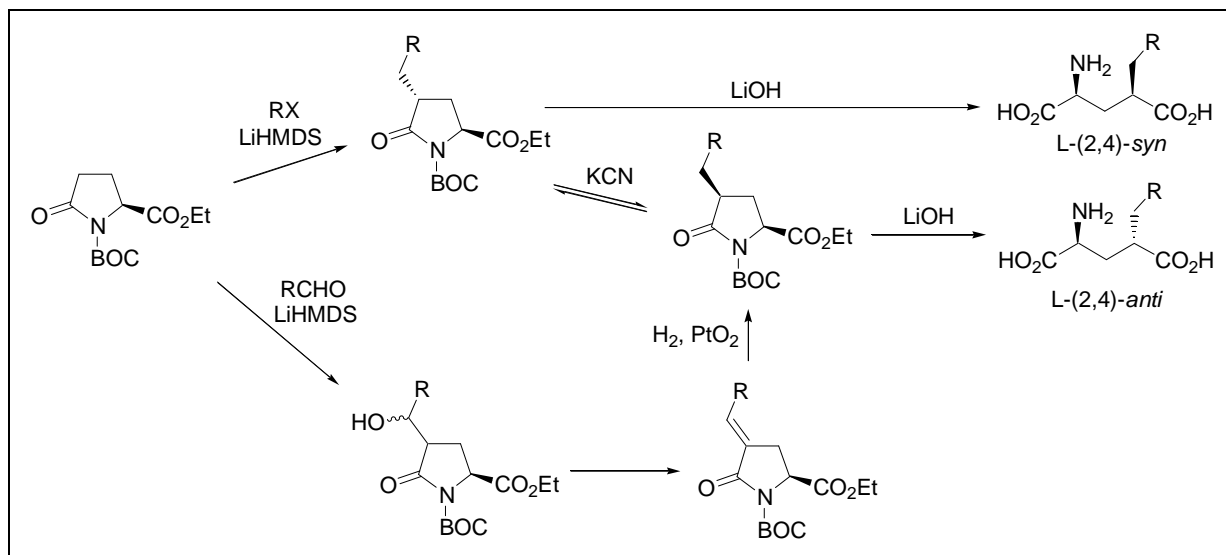


Schéma 12 : synthèse de dérivés 4-alkyl-Glu L-(2,4)-*anti* et *syn*.

De même, l'addition d'un réactif organomagnésien sur le dérivé enaminone vu précédemment, a également offert un accès à une variété de 4-alkyl-Glu de configuration L-(2,4)-*anti*⁵⁵ (Schéma 13).

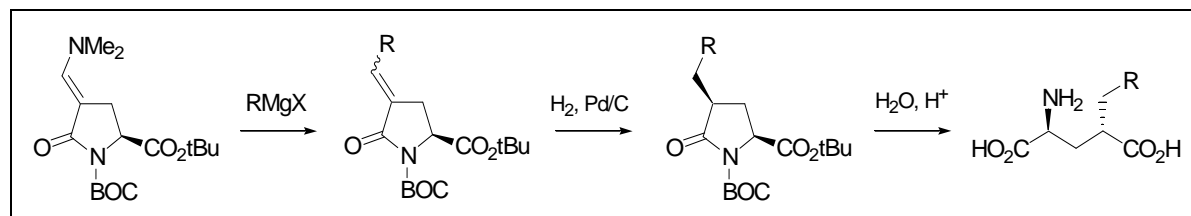


Schéma 13 : addition de Michael sur le dérivé enaminone du pGlu : accès à des dérivés 4-alkyl-Glu L-(2,4)-*anti*.

II.3 Formation de la liaison C²-C³

La condensation de la glycine protégée (Gly) sur un acrylate substitué a permis d'accéder à des analogues du Glu substitués en position 3^{56,57}. Si les groupements protecteurs sont assez encombrants, la réaction est stéréosélective en faveur de l'isomère (2,3)-*anti* (Schéma 14).

⁵⁴ A. Escribano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 765-770.

⁵⁵ C.M. Moody, D.W. Young, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 3519-3530.

⁵⁶ M. Yamaguchi, K. Torisu, T. Minami, *Chem. Lett.*, **1990**, 377.

⁵⁷ M. Nomura, S. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 143.

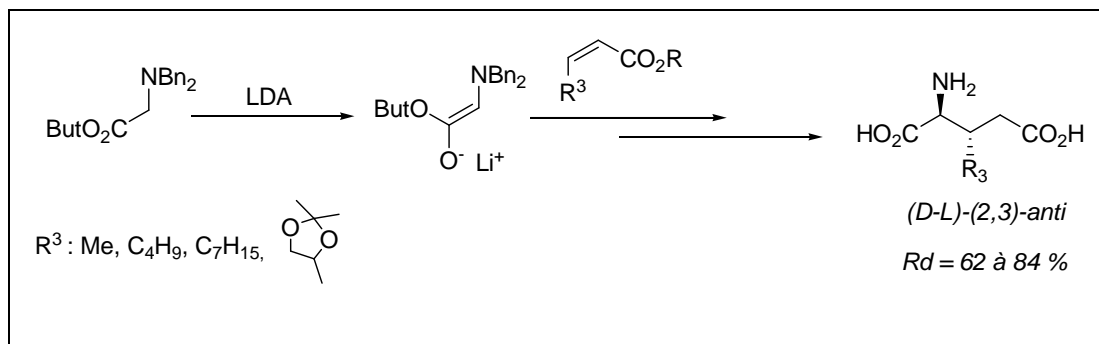


Schéma 14 : condensation de la glycine protégée sur un acrylate substitué.

La glycine activée sous forme d'imine a aussi été utilisée en tant que réactif pour la synthèse d'analogues du Glu⁵⁸. La présence de l'imine permet de stabiliser l'énolate par conjugaison (Schéma 15).

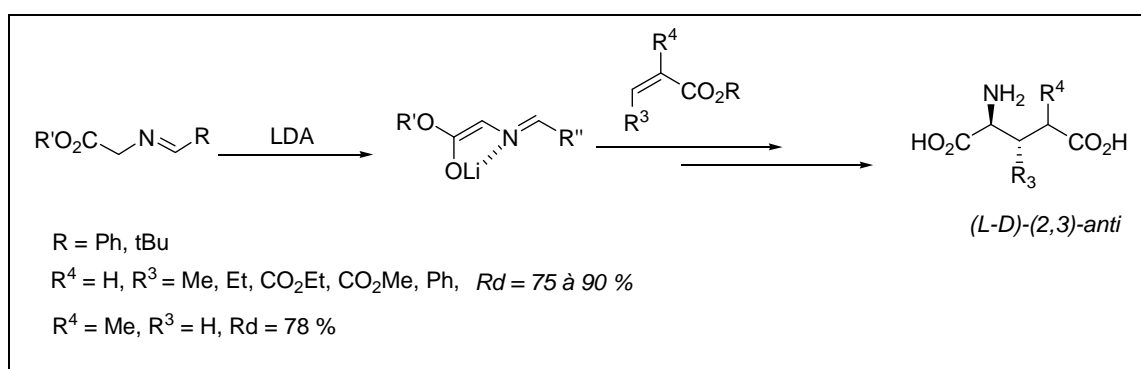


Schéma 15 : utilisation de la glycine sous forme d'imine.

L'utilisation de dérivés carbonylés chiraux tel que le camphre⁵⁹ pour former l'imine, a permis la préparation stéréosélective des analogues D-(2,3)-anti-3-alkyl-Glu (Schéma 16).

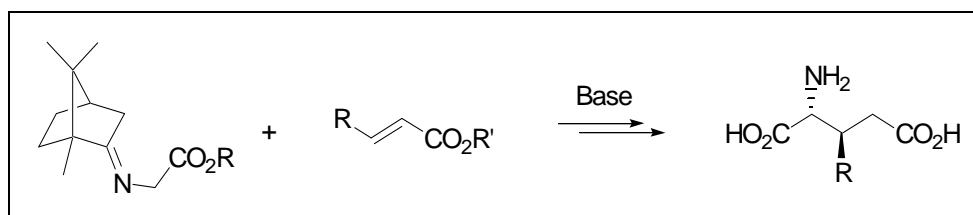


Schéma 16 : utilisation du camphre en tant que copule chirale.

Plus récemment, la 2-hydroxypinan-3-one a également été utilisée comme inducteur chiral^{60,61} : la sélectivité faciale de l'énolate est relativement bonne et permet un bon contrôle de la configuration du carbone 2. La diastéréosélectivité de cette réaction est cependant très faible car l'approche de l'acrylate peut se faire suivant ses deux faces (Schéma 17).

⁵⁸ C. Alvarez-Ibarra, A. G. Csakj, M. Moroto, M. L. Quiroga, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 6700.

⁵⁹ A. Tatsukawa, M. Dan, M. Ohbatake, K. Kawatake, T. Fukata, E. Wada, S. Kanemasa, S. Kakei, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 4221-4227.

⁶⁰ J. Wehbe, V. Rolland, M.L. Roumestant, J. Martinez, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 1123-1126.

⁶¹ J. Wehbe, V. Rolland, A. Fruchier, M.L. Roumestant, J. Martinez, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 851-858.

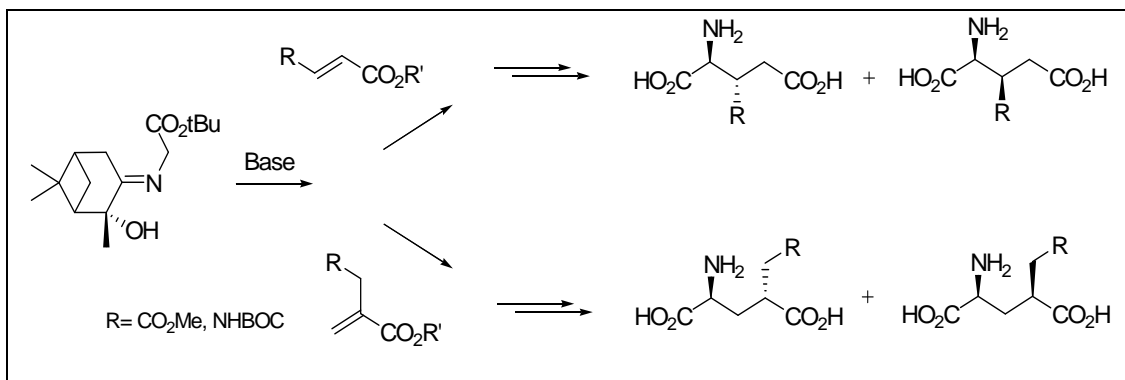


Schéma 17 : utilisation de la 2-hydroxypinan-3-one comme copule chirale.

La glycine a également été utilisée sous forme de diimide. La condensation entre la glycine et la valine forme un diimide cyclique qui a permis la préparation de divers 3-alkyl-Glu avec une excellente stéréosélectivité^{62, 63} (Schéma 18).

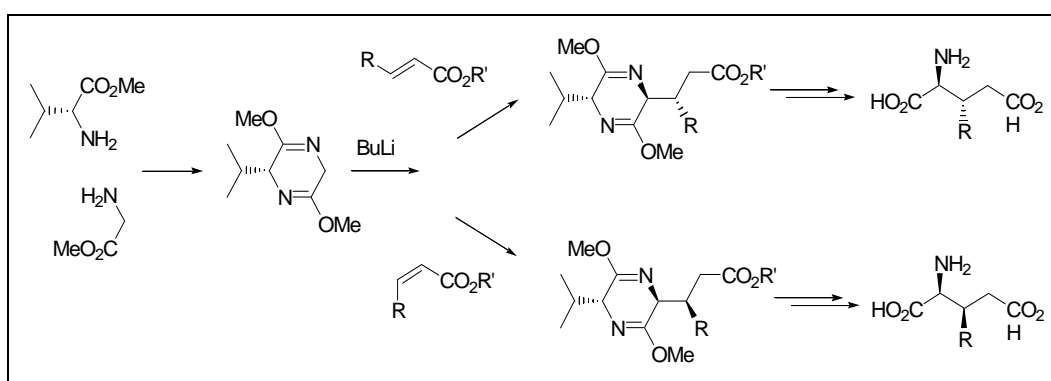


Schéma 18 : utilisation de la glycine sous forme de diimide.

Des acrylates esterifiés par des alcools chiraux ont aussi été utilisés avec des dérivés de la glycine et ont permis la synthèse asymétrique d'analogues du Glu. Nous pouvons citer un exemple original où la condensation d'un dérivé de la glycine sur un bromoacrylate suivie d'une substitution nucléophile intramoléculaire, permet la formation d'un isomère du 2-(carboxycyclopropyl)glycines (L-CCG I)⁶⁴ (Schéma 19).

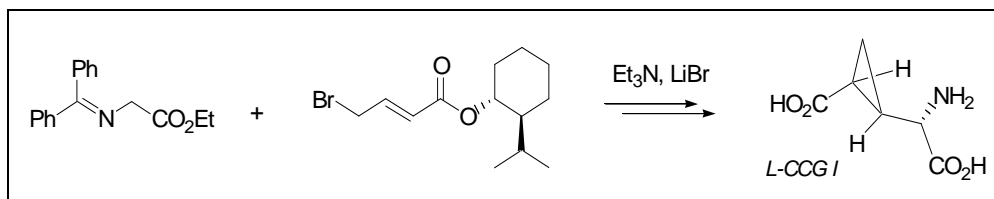


Schéma 19 : synthèse d'un analogue du Glu cyclique à partir d'un acrylate homochiral.

Récemment, la combinaison d'un complexe à base de nickel achiral et d'une N-acryloyloxazolidinone homochirale a permis de préparer plusieurs pyroglutamates substitués en position 3 avec des rendements et des diastéréosélectivités excellents^{65, 66, 67} (schéma 20).

⁶² W. Hartwig, L. Born, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4352-4358.

⁶³ B. Hartzoulakis, D. Gani, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 2525-2531.

⁶⁴ S.P. Chavan, P. Sharma, R. Sivappa, M.M. Bahdbahde, E.G. Gonnade, U.R. Kalkotte, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6817-6819.

⁶⁵ V.A. Soloshonok, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4984-4990.

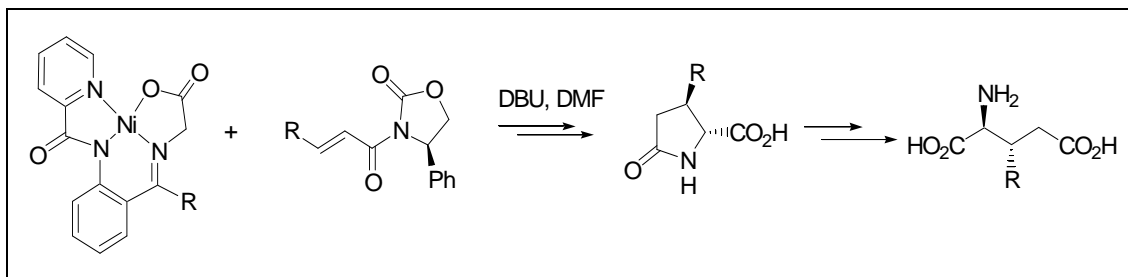


Schéma 20 : Utilisation d'un accepteur de Michael chiral pour la préparation d'analogues du Glu.

Notons de même que le pGlu peut également servir de copule chirale sur l'acrylate⁶⁸.

II.4 Formation de la liaison C³-C⁴

L'aldéhyde de Garner préparé à partir de la sérine et du diméthoxypropane (DMP) a été utilisée comme précurseur dans de nombreuses synthèses d'analogues du Glu. Ainsi, des réactions d'aldolisation offrent un accès au (2*S*,3*R*)-3-hydroxy-Glu⁶⁹ avec un bon excès diastéréoisomérique (Schéma 21).

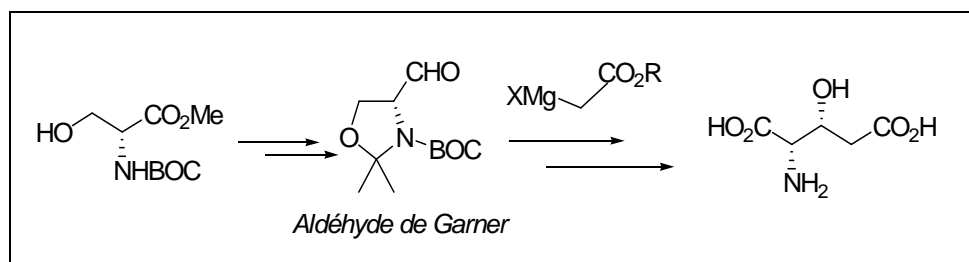


Schéma 21 : Synthèses d'analogues du Glu mettant en jeu l'aldéhyde de Garner.

Une réaction de Wadworth-Emmons a par ailleurs permis de préparer l'intermédiaire A. L'addition diastéréosélective de dialkyl-cuprates sur cet intermédiaire a conduit à plusieurs analogues substitués en position 3 possédant la configuration *syn*^{70,71} (Schéma 23).

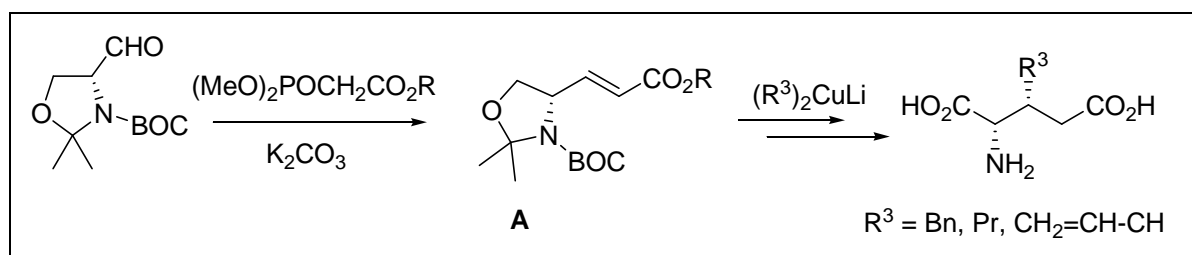


Schéma 22 : Synthèse d'analogues de Glu substitués en position 3, utilisant un dérivé de l'aldéhyde de Garner.

La réaction de **A** avec le malonate de *tert*-butyle offre également un accès à l'acide L- γ -carboxyglutamique (L-Gla), un analogue du Glu fonctionnalisé en position 4⁷² (schéma 23).

⁶⁶ T. K. Hellis, H. Ueki, V. A. Soloshonok, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 941.

⁶⁷ T. K. Hellis, H. Ueki, T. Yamada, Y. Ohfune, V. A. Soloshonok, *J. Org. Chem.*, **2006**, 46, 941.

⁶⁸ C. Cai, T. Yamada, R. Tiwari, V. J. Hruby, V. A. Soloshonok, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 6855-6858.

⁶⁹ P. Garner, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 5855-5858.

⁷⁰ I. Jako, P. Uiber, A. Mann, C-G. Wermuth, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5729-5733.

⁷¹ M. Hashimoto, K. Hashimoto, H. Shirahama, *Tetrahedron* **1996**, 52, 1931-1942.

⁷² S. Jiang, C. C. Lai, J. A. Kelley, P. P. Roller, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 23-25

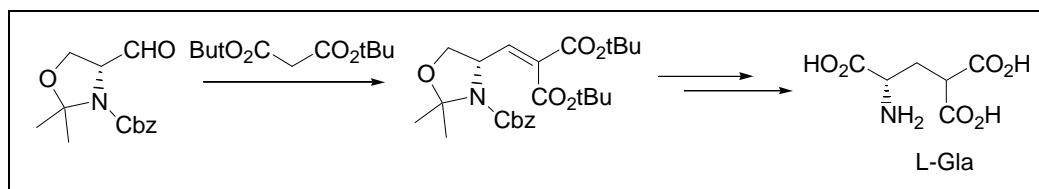


Schéma 23 : synthèse du L-Glu à partir d'un dérivé de la sérine.

L'intermédiaire **A** a également été engagé dans des réactions de cyclopropanation pour préparer plusieurs analogues contraints^{73, 74}.

L'alkylation du produit de réduction de **A** ne s'avère pas diastéréosélective (schéma 24). Cette réaction a tout de même été utilisée pour préparer les (4*R*)- et (4*S*)-(4,4-diphénylbutyl)-L-Glu séparés par chromatographie⁷⁵.

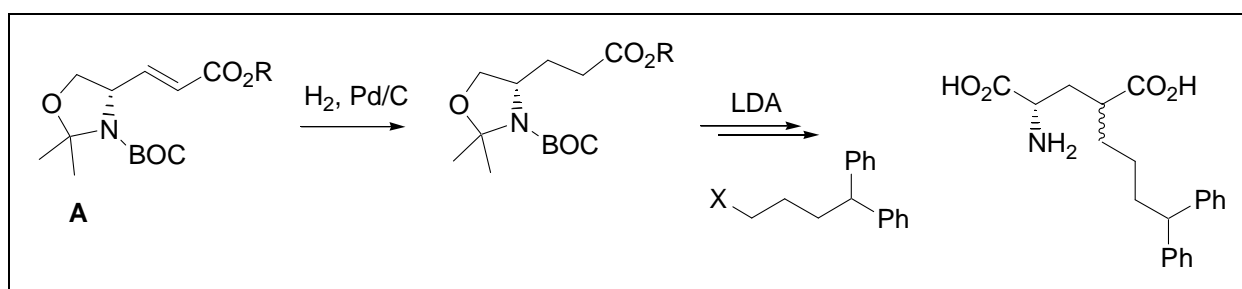


Schéma 24 : alkylation non stéréosélective sur un dérivé de **A**.

En conclusion, de nombreux travaux ont été effectués pour la synthèse d'analogues du Glu. Comme nous l'avons vu, certaines réactions permettent une très bonne diastéréosélectivité. Cependant, aucune méthode générale ne permet d'accéder efficacement aux 2 types d'analogues substitués en 3 ou en 4 ou disubstitués sur ces positions. Enfin, très peu d'exemple d'introduction de groupements fonctionnalisés ont été décrits à ce jour.

D'autres méthodes au caractère moins général ont été développées pour accéder à des analogues du Glu. Parmi celles-ci, nous présenteront dans le paragraphe suivant, quelques méthodes chimio-enzymatiques permettant une préparation stéréosélective d'analogues du Glu.

II.5 Méthodes chimio-enzymatiques pour la synthèse d'analogues du Glu optiquement purs

Plusieurs enzymes sont efficaces pour dédoubler les α aminoacides. Parmi celles-ci, une *D*-aminoacylase⁷⁶ ou encore la papaïne⁷⁷ ont été utilisées pour dédoubler des analogues du Glu substitués en position 4. La papaïne catalyse exclusivement l'amidification des L-aminoacides. Les

⁷³ K. Shimamoto, Y. Ohfuné, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 407-423.

⁷⁴ I. Collado, C. Pedregal, A. Mazón, J.F. Espinoza, J. Blanco-Urgoiti, D.D. Schoepp, R.A. Wright, B.G. Johnson, A.E. Kingston, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3619-3629.

⁷⁵ C.G. Wermuth, A. Mann, A. Shoenfelder, R.A. Wright, B.G. Johnson, J.P. Burnett, N.G. Mayne, D.D. Schoepp, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 814-816.

⁷⁶ A. Vidal-Cros, M. Gaudry, A. Marquet, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 3163.

⁷⁷ Y. Nishida, H. Ohnishi, H. Meguro, *Agric. Biol. Chem.*, **1984**, 48, 1211-1216.

diastéréoisomères obtenus sont ensuite séparés par chromatographie échangeuses d'ions (Schéma 25).

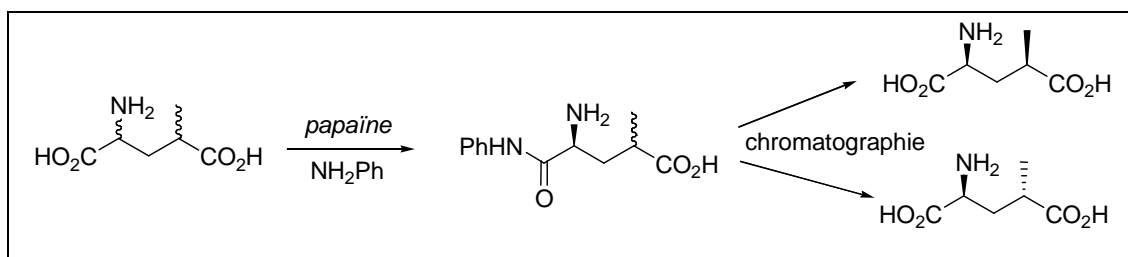


Schéma 25 : dédoublement d'analogues du Glu.

Les aminoacylases peuvent également être utilisées pour dédoubler les aminoacides racémiques en hydrolysant exclusivement l'amide de la série L. La figure suivante présente un exemple de dédoublement du 4-fluoro-Glu préalablement benzoylé⁷⁸.

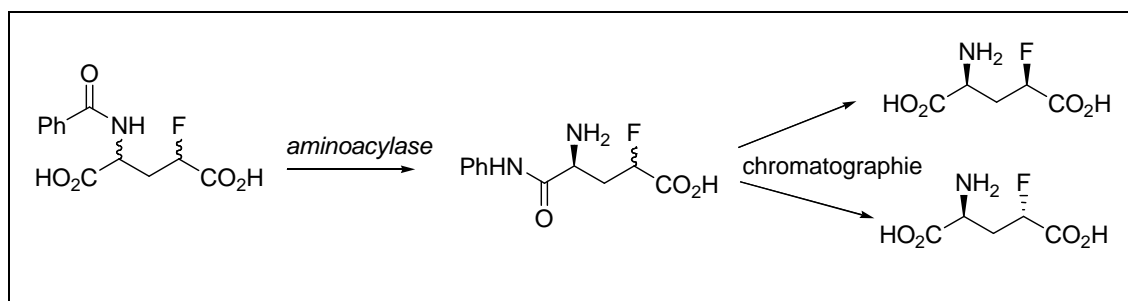


Schéma 26 : dédoublement du 4-fluoro-Glu en utilisant une acylase.

Les dérivés du Glu peuvent aussi être obtenus par amination réductrice du cétoacide correspondant. Ainsi, l'utilisation de la Glutamate Deshydrogenase (GluDH) a permis de préparer certains analogues du Glu de la série L comme les (2S,3R) et (2S,3S)-3-fluoroGlu⁷⁹ (Schéma 27). Le spectre de substrat de cette enzyme demeure cependant très limité.

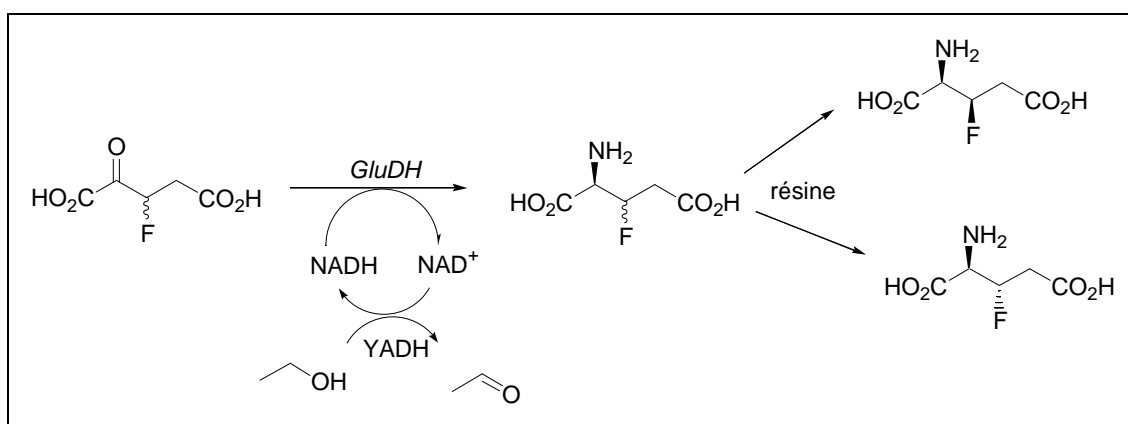


Schéma 27 : préparation des (2S,3R) et (2S,3S)-3-fluoroGlu en utilisant la GluDH.

Cette synthèse utilisant la GluDH a nécessité la mise en place d'un système auxiliaire pour régénérer le cofacteur NADH. L'utilisation de transaminases pour convertir des α -cétoacides en

⁷⁸ Y. Kokuryo et al., *Tetrahedron :Asymetry*, **1996**, 7, 3545.

⁷⁹ A. Vidal-Cros, M. Gaudry, A. Marquet, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 498.

analogues du Glu constitue une alternative. Dans ce cas, le cofacteur n'a pas besoin d'être régénéré. Au laboratoire, l'utilisation des transaminases telles que l'Aspartate Aminotransferase (AspAT) ou la Branched Chain Aminotransferase (BCAT) ont permis, ces dernières années, d'accéder de façon hautement stéréosélective à de nombreux analogues du Glu substitués en 3 et/ou 4.

Cette stratégie nécessite d'avoir accès facilement aux cétoacides correspondants et le développement de méthodes générales pour la synthèse d'analogues de l'acide céto glutarique. La mise au point d'un procédé biocatalytique pour la préparation des dérivés du Glu en utilisant l'AspAT, ont fait l'objet de nombreux travaux antérieurs. Ces derniers seront décrits dans la seconde partie de cette étude bibliographique, à la suite d'une présentation générale des Aminotransférases et de leur utilisation en synthèse organique.

Chapitre III Les Aminotransférases

III.1 Généralités et classification

Les aminotransférases (AT) ou transaminases sont des enzymes qui catalysent le transfert réversible d'un groupement amine entre un composé aminé donneur et un dérivé carbonylé accepteur (schéma 28). Elles jouent un rôle fondamental dans le métabolisme des organismes vivants.

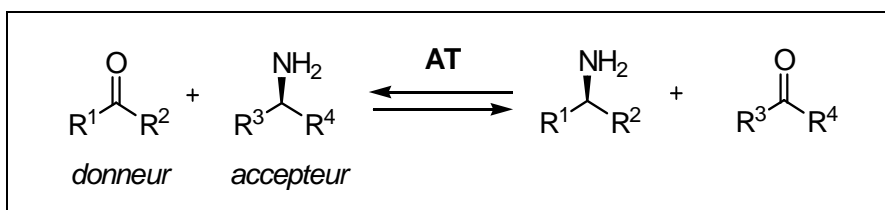


Schéma 28 : réaction de transamination.

Ces enzymes sont nombreuses et variées. Aujourd'hui, 78 ATs sont répertoriées dans la base de données BRENDA⁸⁰. Elles appartiennent à la grande famille des enzymes qui utilisent le phosphate de pyridoxal (PLP) comme coenzyme.

L'importante variété structurale des ATs explique la large gamme de substrats de cette classe d'enzyme. Il existe ainsi une classification des principales ATs suivant leur spécificité de substrat proposée par Mehta et col.⁸¹ (Tableau 6).

Sous-groupe	Enzyme	EC no.	Principaux substrats	
			Aminoacide	Oxoacide
I	AspAT	2.6.1.1.1	L-aspartate (Asp)	2-oxoglutarate (KG)
	AlaAT	2.6.1.1.2	L-alanine	2-oxoglutarate
	TyrAT	2.6.1.1.5	L-tyrosine	2-oxoglutarate
	HisPAT	2.6.1.1.9	L-histidinol-phosphate	2-oxoglutarate
	PheAT	2.6.1.1.58	L-phénylalanine	pyruvate
II	AcornAT	2.6.1.1.11	N-acétyl-L-ornithine	2-oxoglutarate
	OrnAT	2.6.1.1.13	L-ornithine	2-oxoglutarate
	ω-aaAT	2.6.1.1.18	β-alanine	pyruvate
	GabaAT	2.6.1.1.19	4-aminobutyrate	2-oxoglutarate
	DapaAT	2.6.1.1.62	7,8-diaminopérlargonate	S-adenosyl-4-méthylthio-2-oxobutanoate
III	D-AlaAT	2.6.1.1.21	D-alanine	2-oxoglutarate
	BCAT	2.6.1.1.42	L-leucine	2-oxoglutarate
IV	SerAT	2.6.1.1.51	L-sérine	Pyruvate
	PserAT	2.6.1.1.52	L-sérine-3-phosphate	2-oxoglutarate

Tableau 6 : classification des Aminotransférases.

⁸⁰ <http://www.brenda.uni-koeln.de>

⁸¹ P.K. Mehta, T.I. Hale, P. Christen. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 214, 549-561.

Une classification plus large des enzymes à pyridoxal basée sur les analogies structurales a été proposée par Grishin et al.⁸². Elle rassemble quasiment toutes les ATs dans un même sous groupe (groupe structural I dit « fold type I ») à l'exception de la BCAT et de la D-AlaAT (groupe IV). Ces deux sous groupes sont aussi appelés « famille de l'AspAT et famille de la D-AlaAT »⁸³.

La quasi-totalité des ATs présentent donc une structure commune : elle comporte un grand domaine composé d'un feuillet β entouré de boucles et d'hélices où le PLP est fixé, et d'un petit domaine qui ne participe que partiellement à la fixation du substrat (figure 31).

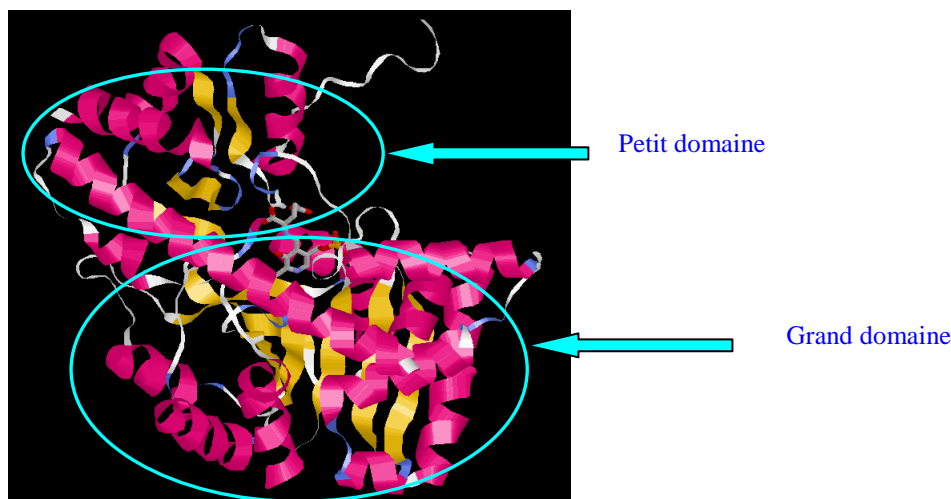


Figure 31 : sous unité de l'AspAT mitochondriale de cœur de poulet complexé avec le PLP et le Glu sous la forme cétimine (structure PDB 1MAQ).

Comme cela apparaît dans le tableau 5, la plupart des ATs sont spécifiques des α -aminoacides et acceptent préférentiellement le couple Glu / KG (schéma 29).

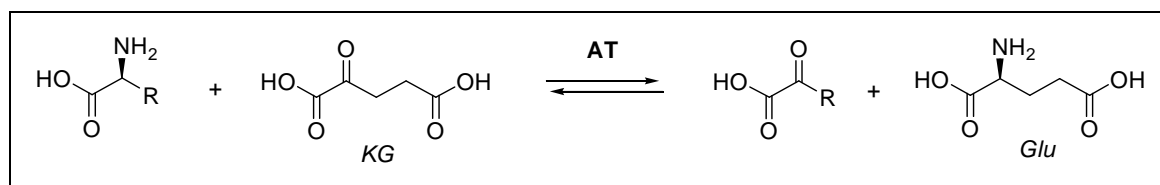


Schéma 29 : réaction générale catalysée par la plupart des ATs.

Les ATs interviennent ainsi dans le métabolisme des acides aminés protéinogéniques. Les plus abondantes d'entre elles assurent l'équilibre métabolique entre les cétoacides majeurs que sont le KG, le pyruvate, l'oxaloacétate et les acides aminés correspondants.

Un certain nombre d'ATs catalysent cependant des réactions différentes de celle décrite dans le schéma 26. Bien que les ATs soient, dans leur très grande majorité, spécifiques des *L*-aminoacides, plusieurs *D*-ATs ont été décrites. Ainsi la *D*-AlaAT (EC 2.6.1.21) a été isolée chez de

⁸² V. Grishin, M.A. Phillips, E.J. Goldsmith, *Protein Sci.* **1995**, 4, 1291-1304.

⁸³ J.N. Jeansonius, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 759-769.

nombreux microorganismes et se caractérise par un très large spectre de substrats. Certaines enzymes catalysent le transfert du groupement amino distant de la position α : la Lysine-KG AT (EC 2.6.1.36) ou l'ornithine-oxoacide transaminase (EC 2.6.1.13) transfèrent vers un α -cétoacide (KG, Pyruvate ou glyoxylate) la fonction amine en bout de chaîne pour conduire à un aldéhyde. D'autre part, des dérivés carbonylés et des amines dépourvues de fonction acide en position α sont les substrats de certaines ATs : on peut citer par exemple, l'histidinol phosphate AT (EC 2.6.1.9) qui participe à la biosynthèse de l'histidine, la GABA-KG transaminase (EC 2.6.1.19) ou encore la β -alanine-pyruvate transaminase (EC 2.6.1.18). Les enzymes de ce type sont souvent regroupées sous le terme générique d' ω -transaminases. Plusieurs ont été isolées chez divers microorganismes. Elles présentent un large spectre de substrat et catalysent la transamination d'amines aussi simples que la n-butylamine. Enfin, plusieurs ATs participent à la synthèse d'aminosucres comme la glutamine-fructose-6-phosphate AT (EC 2.6.1.16) ou encore d'aminocyclitols comme la glutamine-scylo-inosose AT (2.6.1.50). La figure suivante regroupe des exemples de substrats d'aminotransférases différents des α -aminoacides.

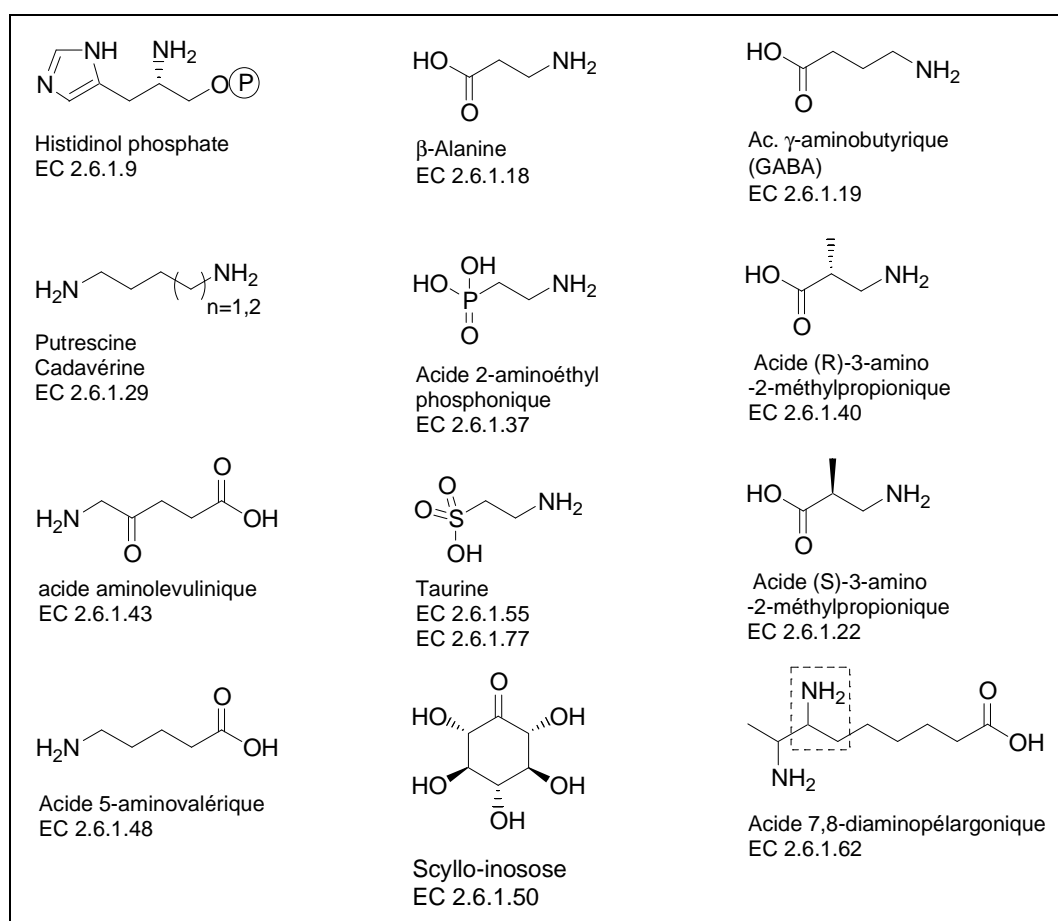


Figure 32: Exemples de substrats d'aminotransférases.

III.2 Mécanisme d'action

III.2.1 Le mécanisme réactionnel

Les études mécanistiques effectuées par Snell⁸⁴ puis Braunstein et Shemyakin⁸⁵ ainsi que par Metzler et al.⁸⁶ ont abouti à l'établissement du mécanisme de la transamination enzymatique. La réaction de transamination se décompose ainsi en deux demi-réactions d'oxydoréduction à la fin desquelles le coenzyme PLP est régénéré. Elle fait intervenir plusieurs intermédiaires réactionnels qui sont l'aldimine externe, le quinonoïde et la cétimine.

Ce mécanisme a ensuite été validé par plusieurs études portant principalement sur l'AspAT que nous développerons plus précisément dans la partie bibliographique, dédiée à l'étude par modélisation moléculaire de l'AspAT.

III.2.2 Aspect cinétique

La réaction de transamination catalysée par les ATs obéit à un modèle cinétique de type « ping pong » BiBi⁸⁷. Il peut être schématisé selon une représentation de Cléland (figure 33a) ou de King-Altman (figure 33b).

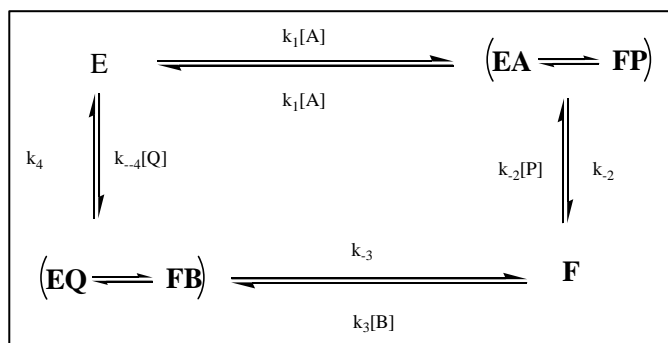


Figure 33a

E : Enzyme libre (sous forme PLP)
A : aminoacide 1 donneur entrant
P : cétoacide 1 produit

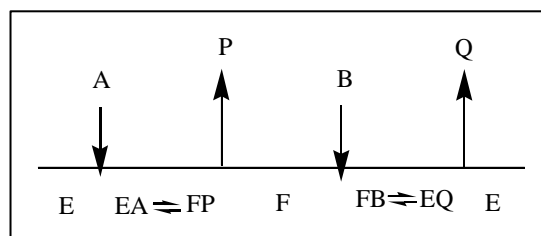


Figure 33b

F : enzyme sous forme PMP
B : cétoacide accepteur 2 entrant
Q : aminoacide 2 produit

L'exploitation mathématique de ce modèle permet, en travaillant en mesure de vitesse à l'état quasi-stationnaire, de formuler une équation où l'inverse de la vitesse de transamination est une fonction qui dépend des concentrations en substrat A et B.

⁸⁴ E. E. Snell, *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, 67, 194.

⁸⁵ A.E; Braunstein, M. M. Shemyakin, *Biokhimiya*, **1953**, 18, 393-411.

⁸⁶ D. E. Metzler et al. , *J. Am. Chem. Soc.* , **1954**, 76, 648-652.

⁸⁷ . H. Segel, « *Enzyme Kinetics* », **1993**, Wiley Classic Library.

On obtient ainsi l'équation suivante :

$$1/V = K_{mA}/(V_{\max} [A]) + 1/V_{\max} (1 + K_{mB}/[B])$$

Équation 1

Cette dernière relation peut se simplifier en travaillant en concentration saturante en l'un des deux substrats. Ainsi si [A] est très importante, le premier terme devient négligeable et l'équation devient la suivante.

$$1/V = 1/V_{\max} (1 + K_{mB}/[B])$$

Équation 2

III.2.3 Principales utilisations des ATs en synthèse

Les ATs ont été utilisées en bioconversion pour la préparation stéréosélective d'acides aminés protéinogéniques, rares ou encore non naturels.

A. Méthodes de déplacement de l'équilibre de transamination

Comme nous l'avons souligné précédemment, la réaction de transamination est réversible et présente une constante d'équilibre proche de 1. Afin d'optimiser le rendement de la transamination en synthèse, il est donc nécessaire de déplacer son équilibre en faveur du composé souhaité. Dans cette optique, il peut être suffisant d'employer un excès d'acide aminé donneur qui est en général le substrat le moins coûteux.

D'autre part, si l'un des produits est éliminé au cours de la réaction, l'équilibre se voit déplacé. Ainsi, suivant la nature de l'acide aminé donneur choisi, le cétoacide correspondant pourra être éliminé au fur et à mesure de sa formation soit par précipitation, soit par évaporation ou encore par transformation chimique (Schéma 30). Plusieurs procédés biocatalytiques qui reposent principalement sur la nature de l'acide aminé donneur utilisé, ont été développés.

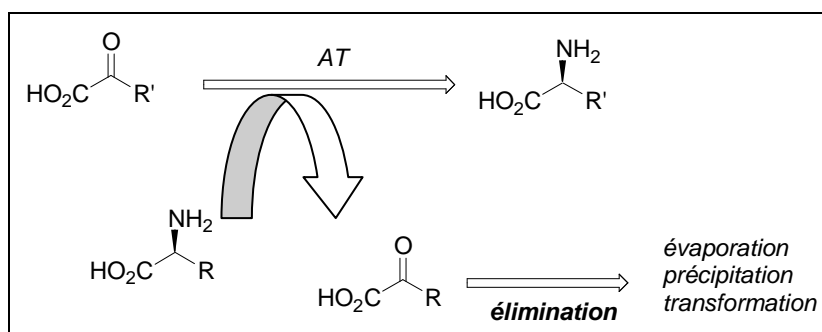


Schéma 30 : stratégie de déplacement de l'équilibre de transamination par élimination du cétoacide formé.

a) Utilisation de l'acide Aspartique (Asp) en tant que donneur

Au cours de la transamination, l'Asp est converti en acide oxaloacétique (OA) qui se décompose en pyruvate accompagné d'un dégagement de CO₂. Cette décarboxylation est assez lente en milieu neutre ou légèrement basique, mais elle peut-être catalysée par des ions métalliques tels que Mn²⁺ ou Mg²⁺⁸⁸, ou par des enzymes comme l'oxaloacétate décarboxylase⁸⁹. Bien sûr, ce procédé n'est efficace que si l'Asp est substrat de l'AT et implique aussi que l'AT ne soit pas active vis-à-vis du pyruvate. Nous pouvons citer l'exemple du procédé mis au point pour la synthèse des acides (2*S*)-2-amino-4-oxo-4-phenylbutyrique et du (3*E*,2*S*)-2-amino-4-phenylbuténoïque en utilisant l'AroAT, enzyme surexprimée dans une souche d'*E.coli*⁹⁰ (Schéma 31). Sans catalyser la décomposition de l'oxaloacetate en pyruvate, le L-aminoacide correspondant est obtenu au bout de 24 h avec un rendement de 68 à 78 % et un excès énantiomérique supérieur à 99 %.

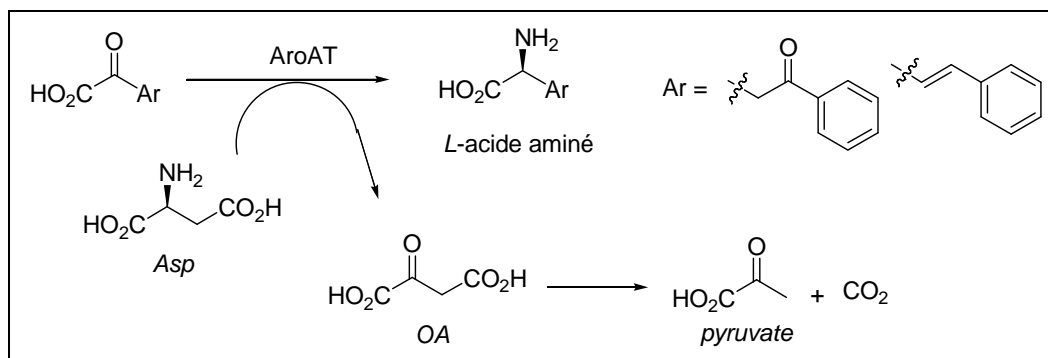


Schéma 31 : synthèse des acides (2*S*)-2-amino-4-oxo-4-phenylbutyrique et du (3*E*,2*S*)-2-amino-4-phenylbuténoïque.

Dans le cas où le pyruvate est substrat de l'AT, l'Acétolactate Synthétase (ALS) a été utilisée pour éliminer le pyruvate. Ce procédé a été mis en œuvre lors de l'utilisation de la D-aaAT et de la TyrAT pour la synthèse des acides D- et L- α aminobutyriques comme le schéma ci-dessous le montre^{91,92,93}. Dans le cas de la synthèse du D-aminobutyrate, le D-Asp utilisé comme donneur d'amine a été obtenu à partir du L-Asp en utilisant une Aspartate racemase.

⁸⁸ J. F. Walter, M. B. Sherwin, **1989**, *US patent* 485859.

⁸⁹ J. D. Rozell, **1985**, *US Patent* 4518692 et 4525454.

⁹⁰ N. W. Fadnavis, S. H. Seo, J. H. Seo, B. G. Kim, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 2199-2202.

⁹¹ D.J. Ager, I. Fotheringham, T. Li, D. Pantaleone, *Enantiomer* **2000**, 5, 235-243.

⁹² I. Fotheringham, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2209-2213.

⁹³ I. Fotheringham, *J. Mol. Cat. B : Enzymatic* **2001**, 11, 199-205.

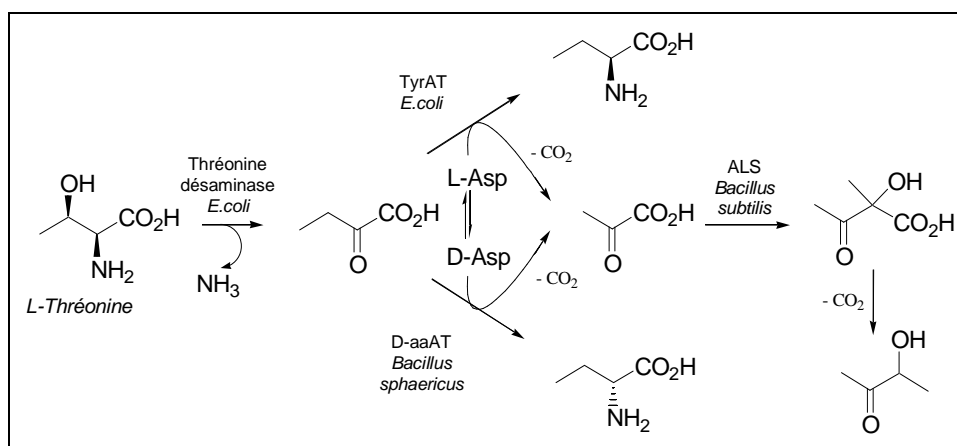


Schéma 32 : procédé biocatalytique pour la synthèse des acides α -aminobutyriques.

b) Utilisation de l'acide Glutamique en tant que donneur

Le Glu est le substrat préférentiel de nombreuses ATs et peut donc être utilisé comme donneur. Plusieurs procédés biocatalytiques développés couplent l'AT à une seconde enzyme responsable de la régénération du Glu utilisé en quantité catalytique.

➤ **Couplage avec l'AspAT**

Dans ce cas, le Glu est régénéré à partir du KG par transamination en présence d'Asp. Comme nous l'avons vu précédemment, la décarboxylation de l'OA formé au cours de la réaction permet de déplacer l'équilibre de l'ensemble des réactions de transamination⁹⁴ (Schéma 33).

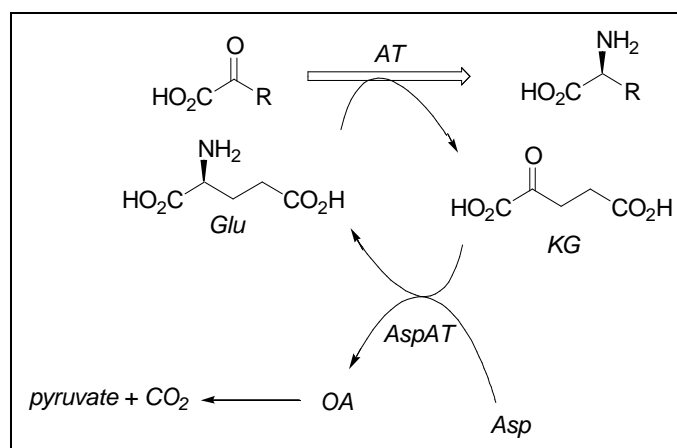


Schéma 33 : régénération du Glu par le couple Asp/AspAT.

Ce procédé a été développé avec les ATs suivantes : BCAT, AroAT, Taurine AT et Cystéine AT pour la préparation d'acides aminés de la série L.

De la même façon, le couplage AspAT/GABAAT a permis d'effectuer la préparation de la L-phosphinothricine qui est le principe actif d'un herbicide de contact couramment utilisé et initialement commercialisé par la firme Hoechst sous le nom de Basta®⁹⁵ (Schéma 34).

⁹⁴ J. D. Rozell, **1989**, *US Patent 4826766*.

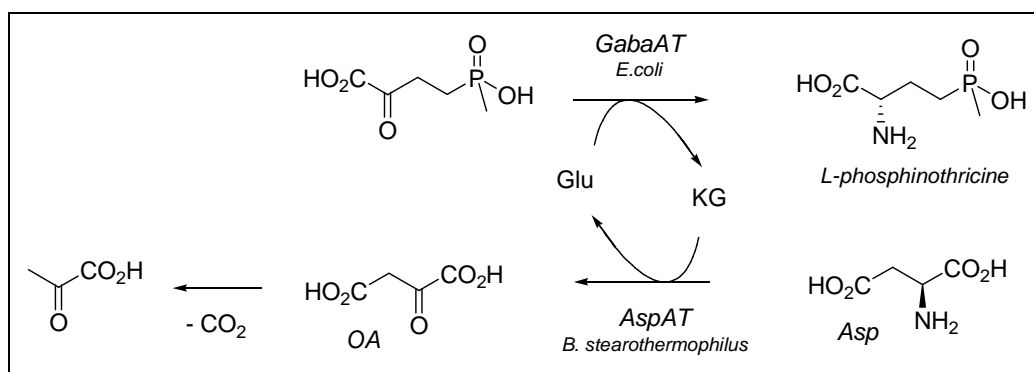


Schéma 34 : préparation de la L-phosphinothricine.

➤ Couplage avec la Glutamate Déshydrogénase (GluDH)

Le Glu est régénéré dans ce cas grâce à la GluDH en incorporant de l'ammoniac dans le milieu réactionnel. Cette réaction consomme le cofacteur NADH qui doit être à son tour régénéré si on souhaite mettre au point un procédé biocatalytique économiquement viable. Plusieurs exemples de cette approche ont été décrits et nous pouvons citer celui développé par Nakajima et al.⁹⁶ décrit par le schéma ci-dessous.

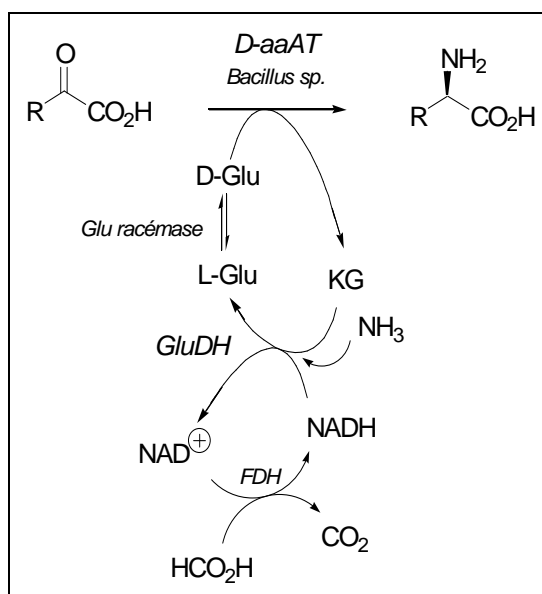


Schéma 35 : procédé biocatalytique pour la synthèse d'acide aminé de la série D.

Divers acides aminés de la série D ont été préparés avec des rendements supérieurs à 80 % en utilisant une D-aaAT d'origine bactérienne et une Glu racémase pour générer le D-Glu à partir du L-Glu. Ce dernier est généré par la GluDH à partir du KG. Le NAD^+ est quant à lui réduit par la formate déshydrogénase (FDH) avec conversion de l'acide formique en CO_2 , transformation irréversible assurant le déplacement global de l'équilibre.

⁹⁵ K. Bartsch, R. Schneider, A. Shultz, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 3794-3799.

⁹⁶ N. Nakajima, K. Tanizawa, H. Tanaka, K. Soda, *J. Biotechnol.* **1988**, 8, 243-248.

➤ Couplage avec l'AlanineAT (AlaAT)

Le Glu peut aussi être aussi régénéré en présence de la *L*-Ala et de l'AlaAT. Dans le cas de la synthèse de la *L*-*tert*-Leucine décrite dans le schéma ci-dessous¹⁴, la réaction met en jeu la BCAT et l'AlaAT. Afin de déplacer l'équilibre, le pyruvate est décarboxylé sous l'action de la pyruvate décarboxylase.

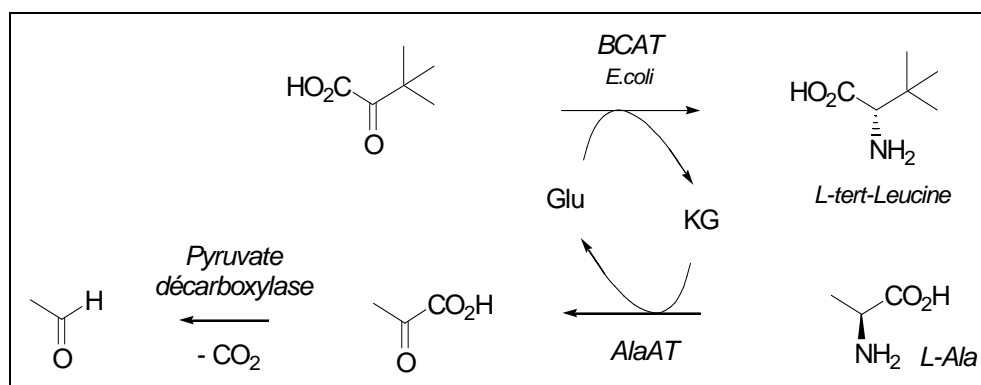


Schéma 36 : Synthèse de la *L*-*tert*-Leucine.

➤ Couplage avec l'Onithine AT (OrnAT)

L'OrnAT est une aminotransférase qui transfère le groupe amino terminal de la chaîne latérale de l'ornithine. L'aldéhyde ainsi formé se cyclise spontanément, ce qui permet de déplacer l'équilibre de la réaction (Schéma 37). La synthèse de la *L*-*tert*-Leucine et celle de l'acide *L*- α -aminobutyrique catalysées respectivement par la BCAT et la TyrAT sont des bons exemples⁹⁷ pour illustrer ce procédé.

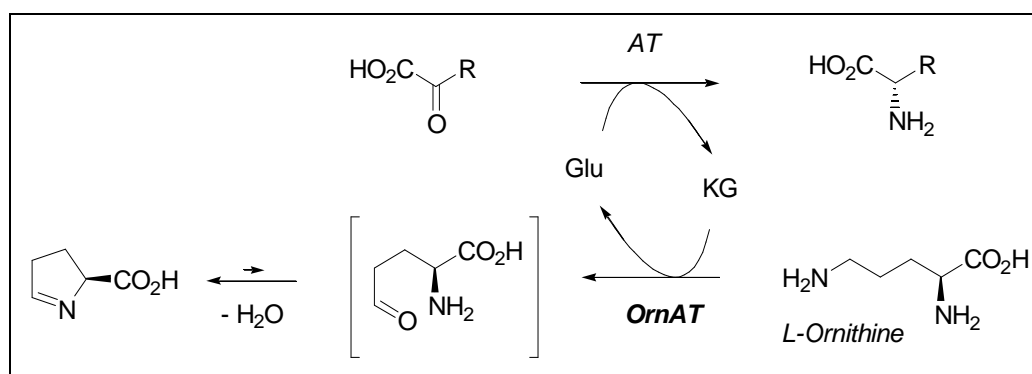


Schéma 37 : déplacement de l'équilibre en utilisant l'OrnAT.

c) Utilisation de l'Alanine (Ala) en tant que donneur

Tout comme le Glu, l'Ala peut être utilisée en quantité catalytique en tant que donneur à condition que cet acide aminé soit substrat de l'AT utilisée. L'Alanine qui est converti en pyruvate après transamination, peut être facilement régénérée en utilisant l'Alanine Déshydrogenase

⁹⁷ T. Li, A.B. Koostra, I.G. Fotheringham, *Org. Proc. Res. & Dev.* **2002**, 6, 533-538.

(AlaDH). Ainsi, Galkin et al.⁹⁸ ont développé un procédé semblable à celui décrit par Nakajima¹⁶, mis à part que le Glu, la GluDH et la Glutamate racémase ont été remplacés par l'Ala, l'AlaDH et l'Alanine racémase. Cette méthode qui couple quatre enzymes permet la préparation d'une variété d'acides aminés de la série D. (Schéma 38)

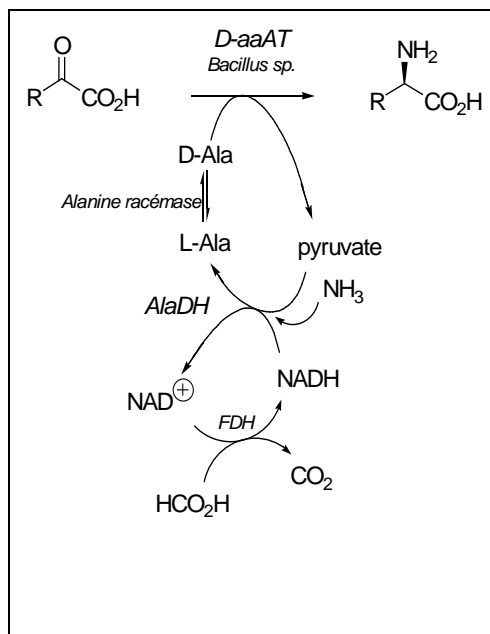


Schéma 38 : procédé multienzymatique pour la synthèse d'acides aminés de série D.

Il a été aussi décrit que lors de l'utilisation de microorganismes entiers comme biocatalyseurs pour ces synthèses, les conditions de fermentation peuvent suffire à assurer la catabolisation du pyruvate et ainsi déplacer l'équilibre de la réaction de transamination⁹⁹.

Par ailleurs, le couplage de l'AlaAT avec des ω -ATs permet de préparer des α -aminoacides de la série L. Dans ce cas, l'Ala est régénérée par un ω -ATs comme le montre le schéma ci-dessous³². Le déplacement de l'équilibre est assuré par la formation favorable d'une cétone conjuguée. Cette réaction de régénération permet, en outre, d'effectuer le dédoublement cinétique de la 1-phényléthylamine.

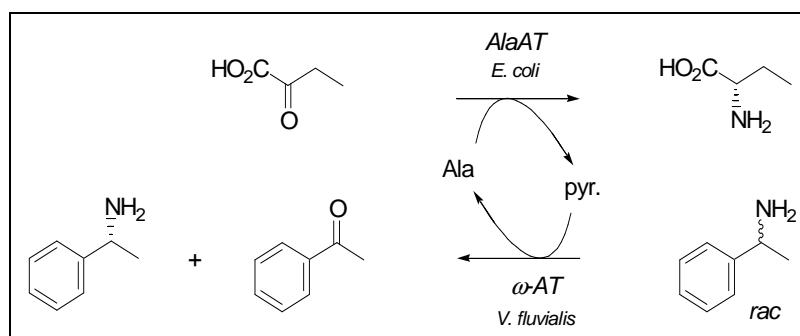


Schéma 39 : couplage de l'AlaAT et de l' ω -AT de *V. fluvialis*.

⁹⁸ A. Galkin, L. Kulakova, T. Yoshimura, K. Soda, N. Esaki, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 4651-4656.

⁹⁹ J-S Shin, B-G Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 65, 206-211.

d) Utilisation de l'acide cystéine sulfinique (ACS) en tant que donneur

L'ACS (préparé par oxydation de la cystine¹⁰⁰) est un analogue très proche de l'Asp et est un bon substrat de l'AspAT¹⁰¹ ($K_m = 14 \text{ mM}$). Il forme après transamination, l'acide sulfinylpyruvique qui est instable et se décompose très rapidement en pyruvate et SO_2 . Son utilisation en tant que donneur permet un déplacement d'équilibre de la transamination plus rapide qu'avec l'Asp. En effet, dans ce cas, aucune catalyse, qu'elle soit chimique ou enzymatique, n'est nécessaire pour éliminer le cétoacide formé. La préparation du β -hydroxy-L-Asp¹⁰² a ainsi été effectuée suivant le procédé décrit dans le schéma suivant.

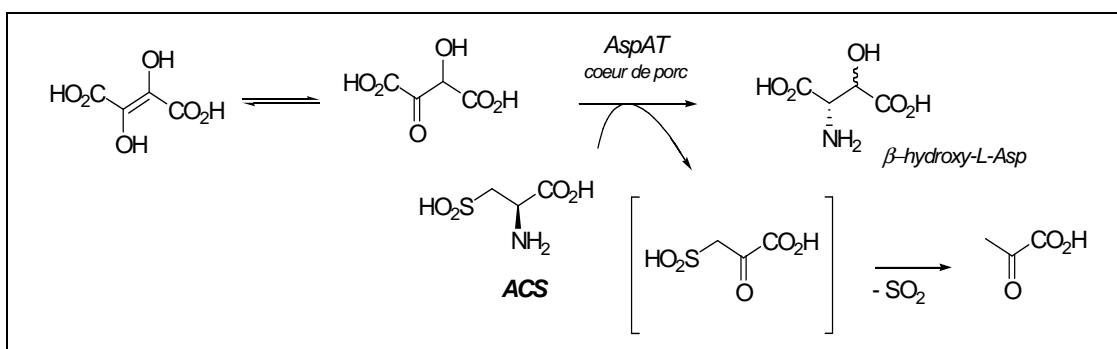


Schéma 40 : synthèse de l'acide β -hydroxy-L-Asp en utilisant l'AspAT et l'ACS en tant que donneur.

Un exemple plus récent de déracémisation de la 2-naphtylalanine (NAla) a été développé au laboratoire en couplant trois enzymes (Schéma 41)¹⁰³. Une D-aminoacide oxydase (DAAO) convertit la D-NAla en naphtylpyruvate qui est transaminé en L-NAla par l'AspAT en présence d'ACS (Schéma 41). L'utilisation d'ACS en tant que donneur d'amine permet le déplacement d'équilibre de l'ensemble du procédé dans lequel la Catalase permet de décomposer le peroxyde d'hydrogène produit dans la réaction d'oxydation.

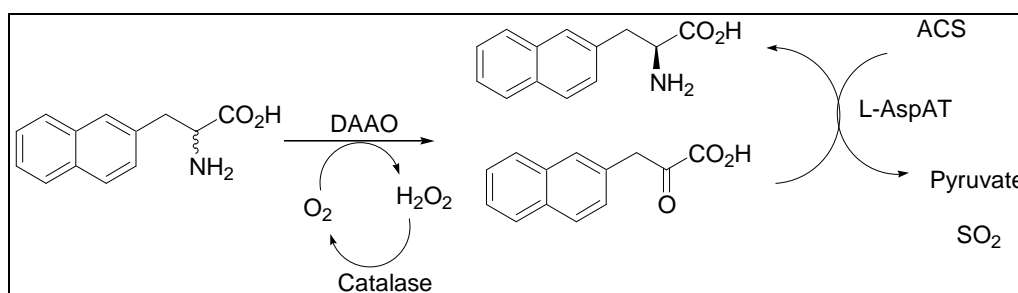


Schéma 41 : deracémisation de la 2-naphtylalanine.

Un autre avantage non négligeable de l'ACS est son point isoélectrique qui est plus bas que celui de la plupart des aminoacides. L'ACS est donc facilement séparé des aminoacides produits de la réaction par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Cette méthode de déplacement

¹⁰⁰ R. Emiliozzi, L. Pichat, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1959**, 1887.

¹⁰¹ W. T. Jenkins, L. d'Ari, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1966**, 22, 376-382.

¹⁰² W. T. Jenkins, *Anal. Biochem.* **1979**, 93, 134-138.

¹⁰³ A. Caligiuri, P. Arrigo, T. Gefflaut, G. Molla, L. Pollegioni, E. Rosini, C. Rossi, S. Servi, *Biocatalysis and Biotransformation*, **2006**, 409-413.

d'équilibre a été largement développée au laboratoire (comme nous le verrons dans le dernier chapitre).

III.2.4 Les principales applications des ATs

Dans le paragraphe précédent, plusieurs exemples d'utilisation des ATs ont permis d'illustrer les différents procédés de bioconversion pour la synthèse d'acides aminés protéinogéniques de la série D ou encore d'acides aminés rares ou non naturels. Les ATs ont également été très utilisées pour la préparation de cétoacides, d'aldéhydes et d'amines chirales.

a) Préparation d'acides aminés protéinogéniques

La plupart des acides aminés naturels sont préparés par des procédés de fermentation à partir de sources simples de carbone et d'azote (glucose, éthanol, ammoniac). Cependant la préparation d'acides aminés aromatiques par transamination à partir des cétoacides correspondants a fait l'objet de très nombreux travaux. Ainsi, la L-Phe a été produite à partir de phénylpyruvate et d'Asp en utilisant différents biocatalyseurs : extraits cellulaires de cœur de porc¹⁰⁴, microorganismes sauvages (Walter^{105,106,107}, Wood^{108,109}) et des microorganismes recombinants surexprimant l'AspAT (Lewis)¹¹⁰ ou la TyrAT d'*E. coli*^{25, 111, 112, 113}.

La tyrosine a également été produite selon les mêmes procédés. La ¹⁵N-Tyr a été préparée avec la TyrAT d'*E. coli* en utilisant le ¹⁵N-Asp ou le ¹⁵N-Glu et un excès de p-hydroxyphénylpyruvate¹¹⁴. Cet exemple montre l'intérêt des ATs pour effectuer ce type de marquage isotopique.

D'autre part, la déracémisation d'un mélange d'isomères L et D d'acides aminés est aussi un moyen d'obtenir facilement les isomères de la série L correspondants avec d'excellents excès énantiomériques. La déracémisation de la Phe ainsi que de ces dérivés comme la phénylglycine ou la 4-ChloroPhe ont fait l'objet de quelques travaux.

¹⁰⁴ S. Sakurai, *Biochemistry* **1956**, 43, 851-855.

¹⁰⁵ J.F. Walter, **1985**, *UK Patent* 215250.

¹⁰⁶ J.F. Walter, M.B. Sherwin, **1986**, *UK Patent* 2161159.

¹⁰⁷ J.F. Walter, M.B. Sherwin, **1989**, *US Patent* 4859591.

¹⁰⁸ L.L. Wood, G.J. Calton, **1986**, *US Patent* 4600612.

¹⁰⁹ L.L. Wood, G.J. Calton, **1987**, *US Patent* 4710467.

¹¹⁰ D.J. Lewis, S.G. Farrand, **1985**, *European Patent* 0152275.

¹¹¹ R. Marquardt, J. Then, H-M. Degger, G. Wohner, M.K. Robinson, A. Doherty, **1992**, *US Patent* 5091314.

¹¹² Y-P. Chao, Z.J. Lai, P. Chen, Z-T. Chern, *Biotechnol. Prog.* **1999**, 15, 453-458.

¹¹³ B.K. Cho, H.J. Cho, H. Yun, B-G. Kim, *J. Mol. Catal. B: enzymatic* **2003**, 26, 273-285.

¹¹⁴ J. A. Zintel, **1973**, *CA Patent* 934313.

b) Obtention d'acides aminés de la série D

Ce sont des produits rares qui présentent un important intérêt pour la préparation de peptides et de peptidomimétiques à visée thérapeutique (composés antiviraux et anticancéreux). En effet, l'introduction d'acides aminés non naturels au sein de la structure de peptides ou de protéines biologiquement actives, améliore leur activité, stabilité, biodisponibilité et affinité.

Plusieurs ATs spécifiques d'acides aminés de la série D ont été extraites de divers microorganismes (principalement de *Bacillus*), clonées et surexprimées chez *E. coli*. Ainsi ces ATs à large spectre de substrats ont été très utiles pour la préparation de D-Ala, D-Asp, D-Leu, D-Met, D-Glu^{31, 33}, D-Phe, D-Tyr^{115, 116, 117} et D-2-aminobutyrate²⁶.

De plus, des D aminoacides peuvent être obtenus à partir de mélanges racémiques en utilisant une AT spécifique des L-aminoacides. Dans ce cas, seul l'énantiomère L du mélange racémique de l'acide aminé subit la transamination catalysée par l'AT. Nous pouvons ainsi citer comme exemple le dédoublement cinétique d'un analogue hétéroaromatique de la phénylalanine réalisé en présence de la L-TyrAT¹¹⁸ (Schéma 42).

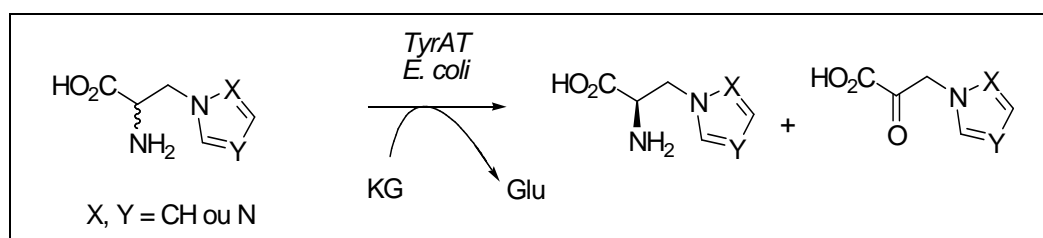


Schéma 42 : exemple de dédoublement cinétique avec la L TyrAT.

c) Préparation d'acides aminés rares ou non naturels

Il existe une forte demande pour les acides aminés rares ou non naturels notamment pour la synthèse de pseudo-peptides en chimie combinatoire. Nous pouvons prendre l'exemple de la synthèse de la L-Homophénylalanine (HPA).

Ce composé est présent dans la structure de plusieurs pseudopeptides qui sont des inhibiteurs de l'enzyme de conversion l'angiotensine (ACE) et utilisés pour le traitement de l'hypertension. L'HPA, analogue de la L-Phe, a été préparé par transamination à partir du cétoacide correspondant en utilisant le couple AspAT/Asp et l'OA décarboxylase pour déplacer l'équilibre⁸⁵. Par ailleurs, un mutant de l'Asp d'*E. coli* (R192E, L18H) s'est montré actif vis-à-vis de la L-HPA et

¹¹⁵ I. Fotheringham, V. Hills, **1996**, *European Patent* 736604.

¹¹⁶ I. Fotheringham, P.P. Taylor, J.L. Ton, **1998**, *US Patent* 5728555.

¹¹⁷ H-S. Bae, S-G Lee, S-P. Hong, M-S. Kwak, N. Esaki, K. Soda, M-H. Sung, *J. Mol. Catal. B: enzymatic* **1999**, 6, 241-247.

¹¹⁸ B.K. Cho, H-Y. Park, J-H. Seo, K. Kinnera, B-S. Lee, B-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 88, 512-519.

de la L-Lys. En 2005, un procédé a été élaboré¹¹⁹ en profitant de la cyclisation spontanée du cétoacide formé à partir de la Lys et de la faible solubilité de la L-HPA pour déplacer l'équilibre de transamination (Schéma 43).

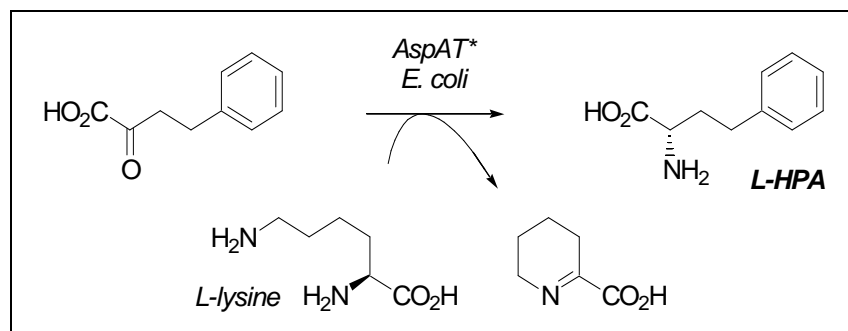


Schéma 43 : synthèse de la L-HPA.

Nous pouvons citer aussi l'exemple de la L-*tert*-Leucine qui présente un intérêt tout particulier pour la synthèse de peptidomimétiques comme les inhibiteurs de la protéase du virus HIV. Sa préparation s'est tout d'abord faite à partir de souches d'*E. coli* recombinantes surexprimant la BCAT et la TyrAT avec l'Asp comme donneur¹²⁰. D'autres souches d'*E. coli* très efficaces ont été obtenues par évolution dirigée (Engel, 2000)¹²¹ : après mutagenèse aléatoire induite par de fortes concentrations en nitrites, les souches d'*E. coli* ont été sélectionnées par culture dans un milieu où la L-*tert*-Leu constitue la seule source d'azote. Les souches ainsi sélectionnées ont une activité accrue vis-à-vis des aminoacides hydrophobes et aromatiques et présentent vraisemblablement des mutations au niveau des gènes *ilvE* et *tyrB* codant respectivement pour la BCAT et la TyrAT.

Récemment, des microorganismes comme *Nocardia diaphanozonaria* ou *Sinorhizobium meliloti*, ont été identifiés par sélection pour leur activité permettant de déracémiser plusieurs aminoacides comme la Phénylalanine (Phe), la 4-Chloro-Phe, la Phénylglycine ou encore l'acide 2-aminoheptanoïque (Schéma 44)¹²². L'inversion de configuration est due à la combinaison de deux réactions enzymatiques au sein du même microorganisme : une oxydation de l'isomère D conduit au cétoacide qui est ensuite converti en L-aminoacide sous l'action d'une transaminase.

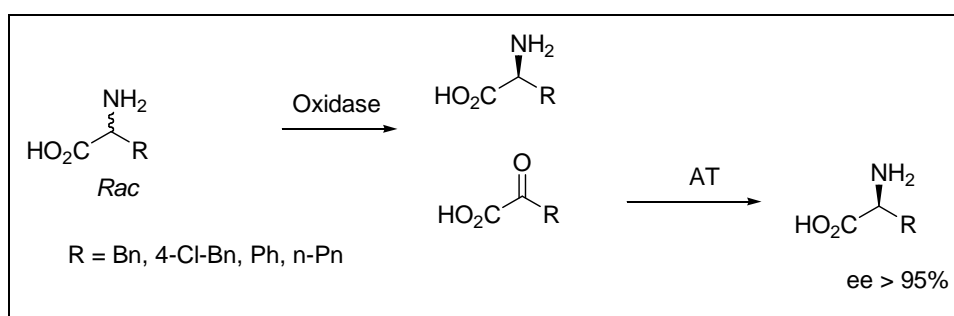


Schéma 44 : déracémisation microbologique d'acides aminés.

¹¹⁹ H.-H. Lo, S.-K. Hsu, W.-D. Lin, N.-L. Chan, W.-H. Hsu, *Biotechnol. Prog.* **2005**, 21, 411-415.

¹²⁰ J. Then, K. Bartsch, H.-M. Deger, S. Grabley, R. Marquardt, **1999**, *US Patent* 5919669 et 5962281.

¹²¹ P.C. Engel, **2000**, *WO Patent* 0037631.

¹²² D. I. Kato, K. Miyamoto, H. Ohta, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2005**, 157-165.

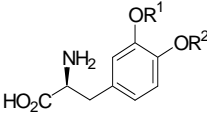
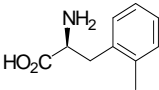
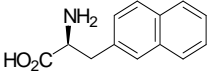
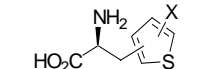
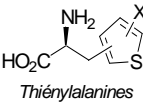
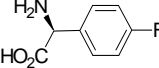
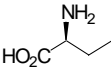
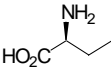
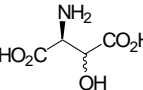
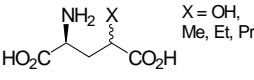
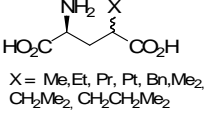
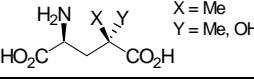
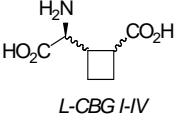
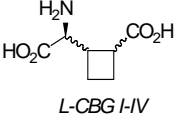
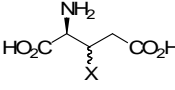
L-aminoacide	Biocatalyseur	Aminoacide donneur	Référence bibliographique
	Cellules entières ou extraits cellulaires de divers microorganismes (Bactéries, levures, champignons)	Glu (2eq.) et Asp (2eq.)	(Nagasaki, 1973) ¹²³
	AspAT d' <i>E.coli</i>	Asp	(Baldwin, 1987) ¹²⁴
	AspAT d' <i>E.coli</i>	Asp	(Baldwin, 1987) ¹²⁵ (Caligiuri, 2006) ¹⁰⁴
	Souche d' <i>E. coli</i> surexprimant une AT hyper-thermostable de <i>Thermococcus profundus</i>	Glu (2eq.)	(Hanzawa, 2001) ¹²⁶
 Thiénylalanines	Cellules d' <i>E. coli</i> surexprimant la TyrAT	Asp	(Meiwes, 1997) ¹²⁷
	Extraits cellulaires de <i>Pseudomonas sp.</i> et <i>Bacillus sp.</i>	Ala et Glu	(Cameron, 2001) ¹²⁸
	Cellules d' <i>E. coli</i> surexprimant la TyrAT	Asp	(Fotheringham, 2001) ⁹⁴
	Cellules d' <i>E. coli</i> surexprimant la L-AlaAT	Ala	(Cho, 2003) ¹²⁹
	AspAT de cœur de porc	ACS	(Jenkins, 1979) ¹⁰³
	AspAT de cœur de porc	ACS	(Passerat, 1987) ¹³⁰ (Echalier, 1993) ¹³¹ (Hélaine, 1999) ¹³²
	AspAT de cœur de porc et d' <i>E.coli</i>	ACS	(Alaux, 2005) ¹⁴
	AspAT de cœur de porc	ACS	(Hélaine, 2001) ¹³³
	BCAT d' <i>E.coli</i>	Glu	(Faure, 2006) ¹⁵
	AspAT d' <i>E.coli</i>	ACS	
	BCAT d' <i>E.coli</i>	ACS	(Xian, 2007) ¹³⁴

Tableau 7 : L-Aminoacides non naturels préparés par transamination enzymatique.

¹²³ T. Nagasaki, M. Sugita, K. Nakagawa, H. Koyama, **1973**, *US Patent* 3767528.

¹²⁴ J.E. Baldwin, R.L. Dyer, C.N. Si, A.J. Pratt, M.A. Russell, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 32, 3745-3746.

¹²⁵ J. E. Baldwin et al., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 32, 3745-3746.

¹²⁶ S. Hanzawa et al., *Biotech. Lett.*, **2001**, 23, 589-591.

¹²⁷ J. Meiwe, M. Shudok, G. Kretschmar, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 527-536.

¹²⁸ M. Cameron, D. Cohen, I.F. Cottrell, D.J. Kennedy, C. Roberge, M. Chartrain, *J. Mol. Catal. B : enzymatic* **2001**, 14, 1-5.

¹²⁹ B-K. Cho, H.J. Cho, S-H. Park, H. Yun, B6G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 81, 783-789.

¹³⁰ N. Passerat, J. Bolte, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1277-1280.

¹³¹ F. Echalier, O. Constant, J. Bolte, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2747-2750.

¹³² V. Hélaine, J. Rossi, J. Bolte, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 6577-6580.

¹³³ V. Hélaine, J. Rossi, T. Gefflaut, S. Alaux, J. Bolte, *Adv. Synth. Catal.*, **2001**, 343, 693-697.

¹³⁴ M. Xian, S. Alaux, E. Sagot, T. Gefflaut, *J. Org. Chem.*, **2007**, sous presse.

Les mêmes auteurs ont, par la suite, cloné et surexprimé le gène de la transaminase (BCAT) de *Sinorhizobium meliloti* chez *E.coli* qui exprime par ailleurs l'enzyme endogène DadA (D-aminoacide déshydrogénase) responsable de l'étape d'oxydation et inductible par addition d'Ala au milieu de culture. Cette souche recombinante est très efficace pour déracémiser la 4-chloro-Phe¹³⁵.

De nombreux autres aminoacides non naturels ont été préparés par transamination enzymatique et sont regroupés dans le tableau 7.

d) Obtention d'amines chirales

Les ω -ATs ont été utilisées pour l'obtention d'amines chirales. En effet ces enzymes ont la particularité d'admettre comme substrats, des dérivés carbonylés qui ne comportent pas de carboxylate en α .

Plusieurs enzymes de cette classe ont été récemment découvertes par un test de sélection qui consiste à faire croître des microorganismes avec comme seule source d'azote une amine. Ainsi c'est en mettant dans le milieu de culture la (*S*)-1-phényléthylamine que le microorganisme *Vibrio fluvialis* a montré une activité ω -AT avec une bonne énantiosélectivité et une forte résistance à l'inhibition par excès de substrat¹³⁶. L' ω -AT de *Vibrio fluvialis* a donc permis la préparation de la (*S*)-1-phényléthylamine ainsi que le dédoublement cinétique de diverses amines chirales (Schéma 45). Dans ce cas, l'accepteur d'amine est le pyruvate et l'équilibre est favorable à la formation de cétones conjuguées.

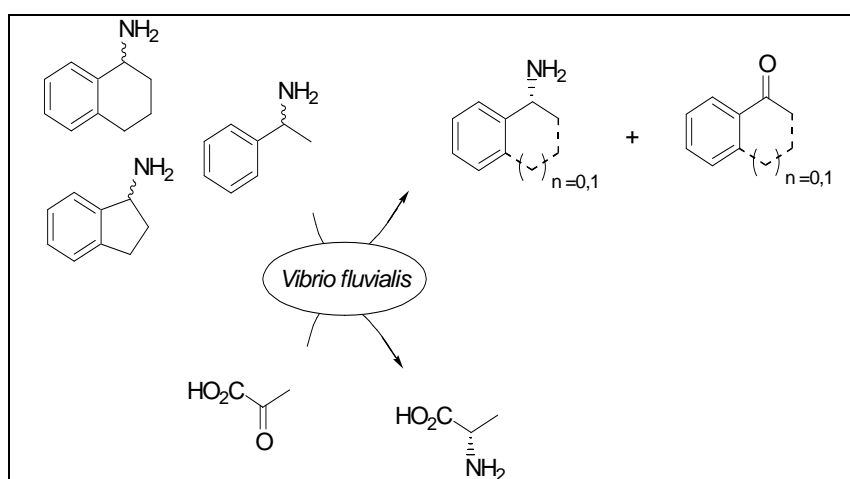


Schéma 45 : dédoublement cinétique d'amines chirales catalysé par *Vibrio fluvialis*.

Plus tard, Shin et al.¹³⁷ ont mis au point un réacteur qui comporte des cellules de *Vibrio fluvialis* immobilisées dans un gel de Ca-alginate. Un système diphasique permet l'extraction en

¹³⁵ D. Kato, K. Miyamoto, H. Ohta, *Biocatalysis and Biotransformation*, **2005**, 23, 375-379.

¹³⁶ J.S. Shin, B-G. Kim, *Biosc. Biotech. Biochem* **2001**, 65, 1782-1788.

¹³⁷ J-S. Shin, B-G. Kim, D-H. Shin, *Enz. Microbiol. Technol.* **2001**, 29, 232-239.

continu des composés cétoniques produits au cours de la réaction, ce qui améliore le déplacement de l'équilibre et évite l'inhibition de l'enzyme.

En ce qui concerne le dédoublement de la *sec*-butalamine¹³⁸, le fait de pouvoir éliminer la butanone par une simple évaporation sous pression réduite facilite le procédé (Schéma 46).

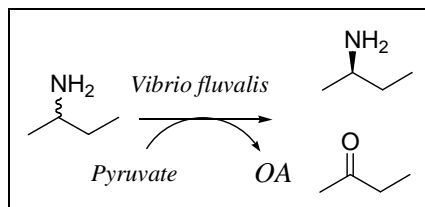


Schéma 46 : dédoublement cinétique de *sec*-butalamine.

Le même type de test de sélection a été mis en œuvre avec des mutants générés par mutagenèse aléatoire à partir de cellules de *Vibrio fluvialis*. En utilisant le 2-aminoheptane comme seule source d'azote et en travaillant en présence de cétones aliphatiques présentant un effet inhibiteur, Kim et al.¹³⁹ ont isolé le mutant ω -TAm1a qui permet le dédoublement cinétique du mélange racémique du 2-aminoheptane obtenu avec un rendement de 50 % et un excellent excès énantiomérique, tout en évitant l'inhibition de l'enzyme à des concentrations importantes en substrat (150 mM).

D'autre part, d'autres microorganismes du genre *Arthrobacter* et *Pseudomonas* présentant une activité ω -AT ont été découverts grâce au même type de test de sélection présentée ci-dessus en utilisant comme source d'azote la (*R*) ou (*S*)-1-(3,4-diméthoxyphényl)-2-aminopropane^{140, 141, 142}.

Récemment, d'autres travaux ont été orientés vers la découverte d'enzymes efficaces pour préparer les β -aminoacides : la sélection de microorganismes sauvages avec l'acide (*S*)-3-aminobutyrique a permis d'identifier une nouvelle ω -AT chez *Alcaligenes denitrificans* (Yun, 2004)¹⁴³. Cette enzyme possède un large spectre de substrat et est, comme les précédentes, active vis-à-vis de la 1-phényléthylamine. La recherche de nouvelles activités β -AT a également été entreprise par évolution dirigée de l' ω -AT de *V. fluvialis*¹⁴⁴ : le gène codant pour l' ω -AT a été muté de façon aléatoire par la technique « d'error prone PCR » et la collection de gènes mutés obtenue a été exprimée chez *E.coli*. Les clones ont été sélectionnés avec un milieu de culture contenant l'acide 3-amino-3-phénylpropanoïque (β -phénylalanine) comme seule source d'azote. Des premiers résultats modestes ont été obtenus par cette approche : des enzymes possédant une activité β -PheAT

¹³⁸ H. Yun, B-K. Cho, B. G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, 87, 772-778.

¹³⁹ H. Yun, B. Y. Hwang, J. H. Lee, B. G. Kim, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, 4220-4224.

¹⁴⁰ Y. Yamada, A. Iwasaki, N. Kasaki, Y. Ikenada, M. Ogura, J. Hasegawa, **2001**, *US Patent* 6221638.

¹⁴¹ A. Iwasaki, Y. Yamada, Y. Ikenaka, Y. Yasohara, J. Hasegawa, **2002**, *US Patent* 6346402.

¹⁴² A. Iwasaki, Y. Yamada, I. Yasuhiro, J. Hasegawa, *Biotechnol. Letters* **2003**, 25, 1843-1846.

¹⁴³ H. Yun, B-K. Cho, B-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 87, 772-778.

¹⁴⁴ B-Y. Hwang, B-G. Kim, *Enz. Microbiol. Technol.* **2004**, 34, 429-436.

accrue par un facteur 3 (par rapport à l'enzyme sauvage) ont été identifiées. Cette année, Kim et al.¹⁴⁵ ont décrit une nouvelle β -AT isolée de *Mesorhizobium sp.* qui présente une importante activité pour les acides β -aminocarboxyliques. Ainsi, l'acide (3*S*)-3-Amino-3-phenylpropionique a été produit à partir de l'acide cétoacide correspondant, lui-même obtenu par hydrolyse du β -cétoester catalysée par une lipase (schéma 47).

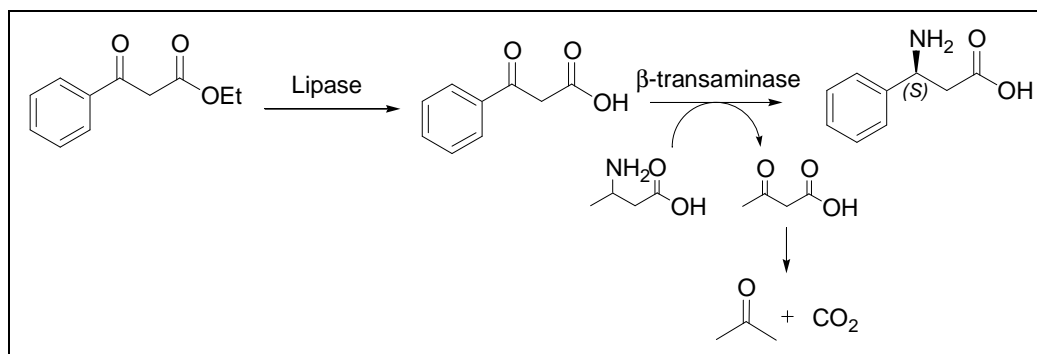


Schéma 47 : préparation de l'acide (3*S*)-Amino-3-phenylpropionique.

D'autre part, il est également intéressant de mentionner que la combinaison d'une transketolase (TK) et de la β -alanine:pyruvate transaminase (β -APAT) permet la préparation d'aminoolcools chiraux. Ainsi le 2-amino-1,3,4-butanetriol (ABT), un important synthon pour la préparation de nombreuses molécules d'intérêt pharmaceutique, a été synthétisé récemment en utilisant un microorganisme recombinant exprimant à la fois la TK et la β -APAT à partir de composés non chiraux (schéma 48). Le rendement se limite cependant à 21 % due à la décomposition de l'ABT en présence de l'extrait cellulaire¹⁴⁶.

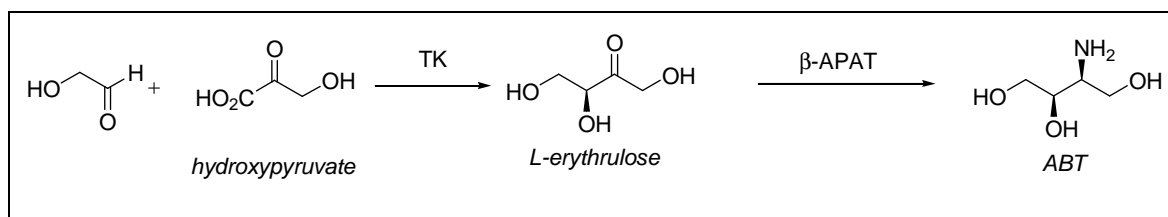


Schéma 48 : préparation d'ABT pour un procédé biocatalytique.

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons dire que les ATs constituent des outils efficaces pour la synthèse d'un grand nombre d'acides aminés chiraux. L'utilisation de ces enzymes représente donc une alternative très intéressante aux méthodes conventionnelles de synthèse.

¹⁴⁵ J. Kim, D. Kyung, H. Yun, B. K. Cho, J. H. Seo, M. Cha, B. Kim, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, 73, 1772-1782.

¹⁴⁶ C. U. Ingram, M. Bommer, M. E. B. Smith, P. A. Dalby, J. M. Ward, H. C. Hailes, G. J. Lye, *Biotechnol. and Bioeng.*, **2007**, 96, 559-569.

Chapitre IV Synthèse d'analogues du Glu par transamination : travaux antérieurs

Comme nous l'avons évoqué dans les chapitres précédents, une approche chimio-enzymatique a été développée au laboratoire pour préparer des analogues du Glu substitués en position 3 et/ou 4 (Schéma 49). Cette approche consiste à convertir par transamination enzymatique des analogues de l'acide 2-oxoglutarique (KG) en analogues du Glu de façon hautement stéréosélective.

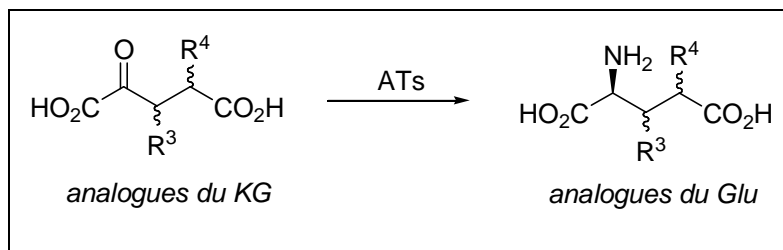


Schéma 49 : synthèse générale des analogues de Glu par transamination.

Les enzymes jusqu'ici utilisées, sont : l'AspAT de cœur de porc, l'AspAT d'*E.coli* et la BCAT d'*E.coli*. Ces deux enzymes bactériennes ont été produites et purifiées au laboratoire à partir de souches recombinantes qui surexpriment ces enzymes.

La stratégie de synthèse développée n'est efficace que si on accède facilement aux analogues du KG. Ainsi, de nombreux efforts ont été faits au cours de ces 10 dernières années pour développer des méthodes de synthèse, simples et générales, pour la préparation des analogues du KG. Ces travaux ont fait l'objet de deux thèses (V. Helaine, 1995-1999 et S. Alaux, 1999-2002) qui ont concerné la préparation de 4-alkyl-Glu en utilisant l'AspAT. Un stage post-doctoral (Mo Xian, 2003-2004) a par ailleurs porté sur l'étude de la BCAT pour la synthèse de L-3-alkyl-Glu.

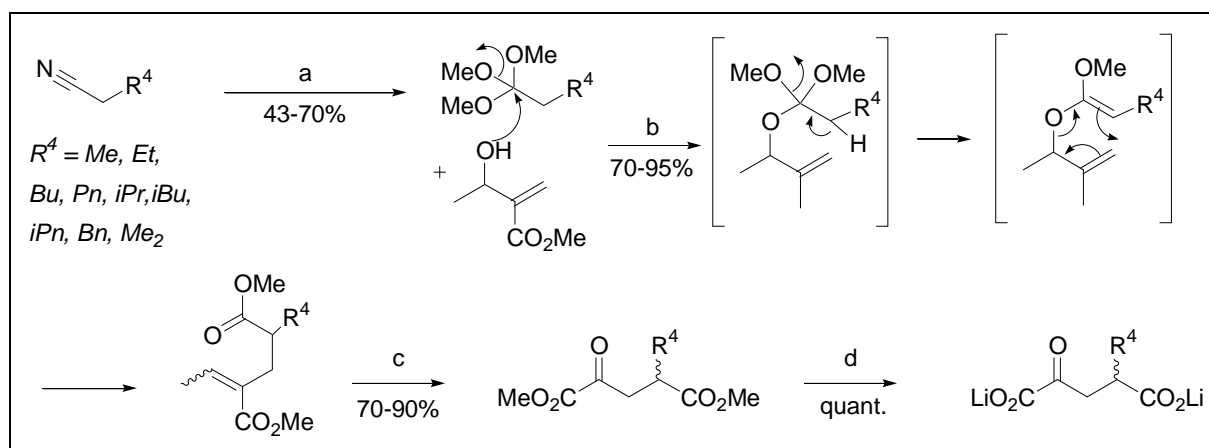
Dans cette partie, sont présentés les travaux antérieurs à ma thèse, effectués au laboratoire. Cette présentation concerne, en particulier, les différentes méthodes envisagées pour la préparation des analogues du KG par voie chimique et les études de spécificité de substrat de l'AspAT et de la BCAT.

IV.1 Préparation des analogues du KG

De nombreux travaux ont eu pour objectif la mise au point de méthodes simples qui permettent de préparer une variété d'analogues du KG substitués en position 3 et/ou 4. Deux voies de synthèse principales ont été développées ces dernières années au laboratoire. Elles sont basées soit sur le réarrangement de Claisen-Johnson soit sur la condensation de Michael, pour créer le squelette carboné des analogues du KG.

IV.1.1 Méthode faisant intervenir le réarrangement de Claisen-Johnson

V. Helaine a mis au point, lors de sa thèse, une méthode basée sur le réarrangement de Claisen-Johnson. Ainsi, la condensation de l' α -hydroxyméthylacrylate de méthyle sur un orthoester produit un acétal de cétène qui se réarrange pour former un 2-alkylidèneglutarate (Schéma 50). Ce dernier subit ensuite une coupure oxydante qui peut se faire soit par ozonolyse à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, soit en présence de RuO_2 et NaIO_4 à température ambiante. Enfin, la saponification du cétoester s'effectue facilement en présence d'une quantité stœchiométrique de LiOH dilué.



Réactifs et conditions : (a) i : MeOH , HCl , 0°C ; ii : MeOH , cyclohexane, reflux ; (b) EtCO_2H , PhCH_3 , reflux ; (c) NaIO_4 , RuO_2 , H_2O , CCl_4 , CH_3CN ou O_3 , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis Me_2S ; (d) LiOH , H_2O , THF ou MeOH .

Schéma 50 : synthèse de 4-alkyl-KG.

Cette méthode a permis la préparation des mélanges racémiques des 4-méthyl, éthyl et propyl-KG¹⁴⁷, ainsi que des 4-butyl (Bu), pentyl (Pn), isopropyl (iPn), isobutyl (iBu), isopentyl (iPn), benzyl (Bn) et diméthyl-KG¹⁴ avec des rendements globaux satisfaisants. Les orthoesters utilisés sont soit commerciaux, soit préparés à partir des nitriles correspondants suivant la méthode de Pinner¹⁴⁸. L' α -hydroxyméthylacrylate est quant à lui facilement accessible, par condensation de Baylis-Hillman entre l'acrylate d'éthyle et l'acétaldéhyde en présence du catalyseur nucléophile DABCO (diazabicyclo[2.2.2]octane, Schéma 51).

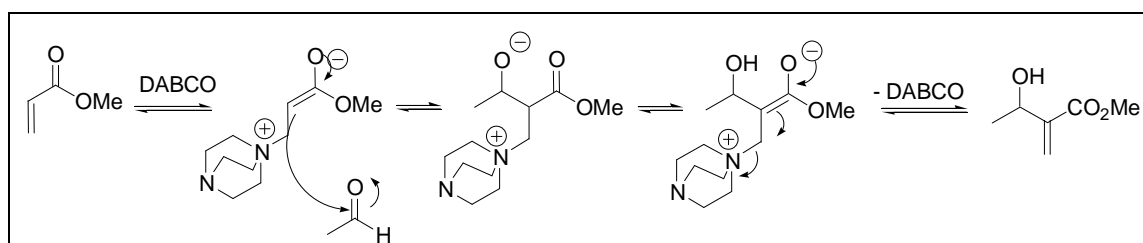


Schéma 51 : synthèse de l' α -hydroxyméthylacrylate de méthyle par la condensation de Baylis-Hillman.

¹⁴⁷ V. Helaine, J. Rossi, J. Bolte, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 6577-6580.

¹⁴⁸ A. Pinner, *Chem. Ber.*, **1883**, 16, 352-1643.

Les analogues du KG alkylés en position 3 peuvent être aussi préparés à partir d'un α -hydroxyméthylacrylate substitué en β . Cependant, ces dérivés ne peuvent être obtenus directement par la condensation de Baylis-Hillman, qui est inefficace avec les acrylates substitués.

Le dérivé 3-phényl-KG a pu être préparé à partir du 2-hydroxyméthyl cinamate de méthyle lui-même obtenu par un réarrangement favorable du produit de condensation de Baylis-Hillman entre l'acrylate de méthyle et le benzaldéhyde (schéma 52).

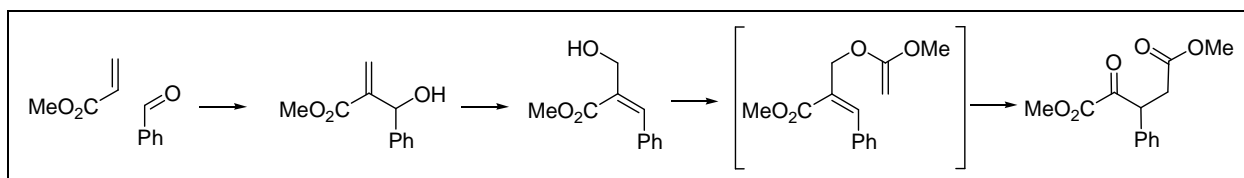


Schéma 52: synthèse du 3-Ph-KG.

Cependant, le 2-hydroxyméthyl-crotonate, précurseur du 3-méthyl-KG, n'a été obtenu qu'avec un très faible rendement (=10%) à partir du produit de Baylis Hillamn correspondant.

La méthode développée par la suite a permis, quant à elle, d'accéder plus facilement aux dérivés substitués en position 3.

IV.1.2 Utilisation de la condensation de Michael

Une première méthode, simple et efficace, a permis de préparer les 3-méthyl et 3-éthyl-KG à partir du produit de condensation de Michael d'un nitroacétate sur un acrylate substitué. Le produit de la condensation de Michael peut être converti en nitronate en présence d'une base et ensuite ozonolysé pour former le cétoester correspondant (Schéma 53). Les rendements globaux obtenus vont de 46 à 60 %. Cette méthode a malheureusement été abandonnée car les esters de l'acide nitroacétique sont des produits fortement irritants et allergènes.

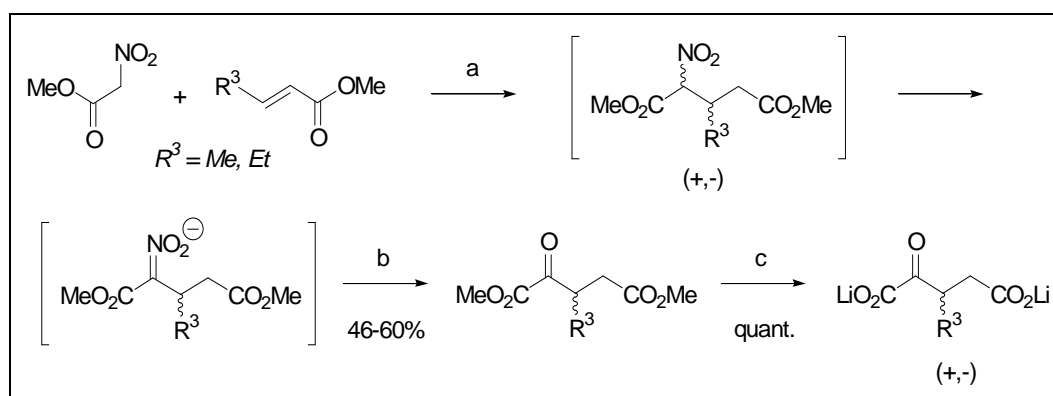
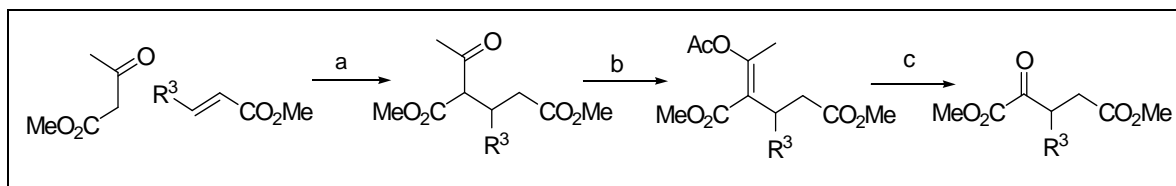


Schéma 53 : synthèse de 3-alkyl-KG par la réaction de Michael et l'oxydation de nitroacétates.

La même stratégie a été envisagée en remplaçant le nitroacétate par un acétoacétate. Ainsi, après condensation sur un acrylate substitué, il se forme un β -cétoester qu'on peut facilement

convertir en acétate d'énol¹⁴⁹. Après ozonolyse et saponification des esters, on obtient un analogue du KG substitué en 3 (Schéma 54).



Réactifs et conditions : (a) base, MeOH, 60°C. ; (b) pyridine, AcCl, Ta ; (c) O₃, CH₂Cl₂, -78°C puis Me₂S.

Schéma 54 : synthèse de 3-alkyl ou 4-alkyl-KG.

L'oxydation, lorsqu'elle est directement effectuée sur l'énolate alcalin du β-cétoester, conduit majoritairement à une hydroxylation en position α formant un alcool tertiaire. Il est apparu nécessaire de piéger l'énolate sous la forme d'un acétate d'énol ou d'un éther silylé avant d'effectuer l'ozonolyse. Les acétates d'énol sont apparus adaptés étant plus stables que les éthers silylés et peuvent être purifiés par chromatographie sur colonne de silice.

Le tableau suivant présente les rendements obtenus pour la synthèse de 3-alkyl-KG.

R ³	R ⁴	Rendements (%)		
		étape a	étape b	étape c
Me	H	64	66	58
Et	H	63	65	70
Pr	H	60	61	71

Tableau 8 : rendements obtenus lors de la synthèse de 3-alkyl-KG.

Comme nous le verrons, cette méthode générale de synthèse d'α-cétoacides a été utilisée dans le cadre de mes travaux de thèse afin d'élaborer une variété d'analogues du KG substitués en position 4 par des groupements fonctionnalisés.

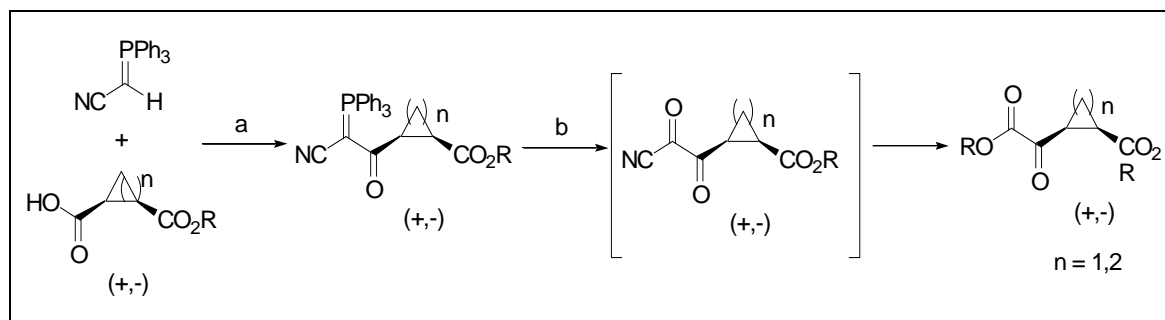
IV.1.3 Utilisation de la méthode de Wasserman

La méthode de Wasserman a été utilisée pour préparer des analogues cycliques du KG, susceptibles d'être convertis par transamination en analogues contraints du Glu.

Cette méthode constitue une approche efficace pour l'homologation d'un acide carboxylique en α-cétoester¹⁵⁰. L'enchaînement réactionnel comprend tout d'abord le couplage de l'acide avec un cyanophosphorane. L'ozonolyse du produit de couplage conduit à un α-dicétonitrile dont l'alcoolyse *in situ* donne un α-cétoester (schéma 55 et Tableau 9).

¹⁴⁹ M. Xian, S. Alaux, E. Sagot, T. Gefflaut, *J. Org. Chem.*, **2007**, sous presse

¹⁵⁰ H.H. Wasserman, W.B. Ho, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4364-4366.



Réactifs et conditions : (a) EDCI, DMAP, CH_2Cl_2 ; (b) O_3 , ROH, CH_2Cl_2 , -78°C puis Me_2S .

Schéma 55 : Synthèse d'analogues cycliques du KG par la méthode de Wasserman.

R	n	configuration	étape a (%)	étape b (%)
Me	1	cis	87	90
Me	2	cis	88	82
Bn	2	cis	89	62

Tableau 9 : rendement pour chaque étape de la synthèse décrite dans le schéma 55.

Des rendements bons à très bons ont été obtenus dans tous les cas. Les monoesters de départ de configuration *cis* ont été préparés par alcoolyse des anhydrides correspondants (Schéma 57).

L'anhydride cyclobutanique a été obtenu par photocycloaddition (2+2) de l'éthylène et de l'anhydride maléique.

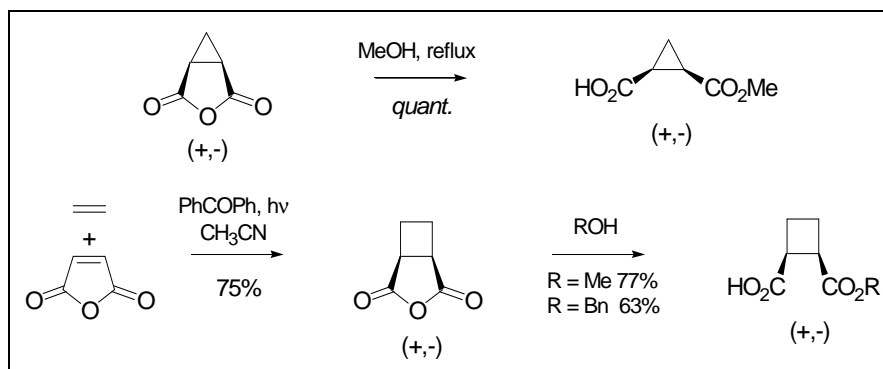


Schéma 56 : Synthèse des monoesters des acides cis-cycloalcanes-1,2-dicarboxyliques.

Une isomérisation *cis-trans* a été observée lors de l'étape finale d'hydrolyse des esters en milieu basique. Des mélanges de dérivés *cis* et *trans* ont donc été isolés mais toujours avec le dérivé *trans* majoritaire (>90 %) ¹⁵.

Dans le cas du dérivé cyclobutanique, pour accéder à l'isomère *cis*, le diester benzylique a été préparé. Ainsi, la déprotection finale par hydrogénolyse préserve l'intégrité stéréochimique de ce composé (Schéma 57).

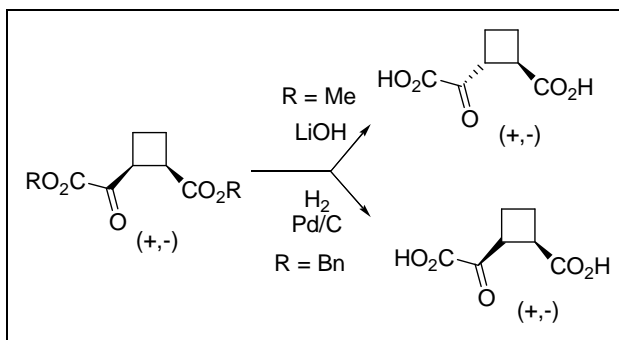


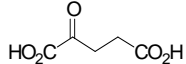
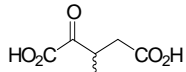
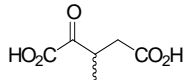
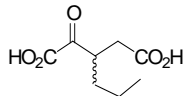
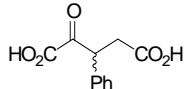
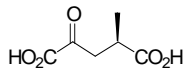
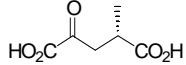
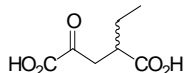
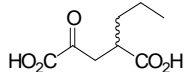
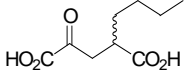
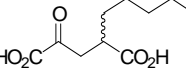
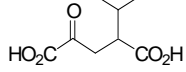
Schéma 57 : obtention des dérivés cyclobutaniques *cis* et *trans*.

D'autres études au caractère général ont par ailleurs permis d'accéder à d'autres analogues du KG, en particulier les analogues hydroxylés en position 4. L'ensemble de ces dérivés ont permis de mener une étude de spécificité de substrat avec les 3 ATs disponibles au laboratoire. Les parties suivantes présentent les résultats obtenus dans le cas de l'AspAT et de la BCAT, et décrivent les procédés catalytiques employés pour la préparation des différents analogues du Glu.

IV.2 Etude et utilisation de l'AspAT

IV.2.1 Etude cinétique

Le tableau 10 présente les paramètres cinétiques déterminés dans le cas des 3 et 4-alkyl-KG et de ses dérivés cycliques avec l'AspAT de cœur de porc et d'*E.coli*. Les valeurs de k_{cat} et du rapport k_{cat}/K_m sont exprimées en pourcentage relatif au substrat naturel c'est à dire au KG. Contrairement aux isomères 4-méthyl-KG, les mesures ont été effectuées sur les mélanges racémiques des dérivés alkylés ou cycliques. Dans les cas où l'enzyme manifeste une énantiopréférence, les valeurs des K_m sont donc en réalité deux fois plus faibles que les données expérimentales indiquées dans le tableau.

Substrat	AspAT de cœur de porc			AspAT d' <i>E. coli</i>		
	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)
	$0,23 \pm 0,04$	100 ± 3	100 ± 18	$0,23 \pm 0,05$	100 ± 3	100 ± 22
	$5,4 \pm 1,0$	13 ± 1	$0,5 \pm 0,1$	$16,3 \pm 3,7$	48 ± 11	$0,7 \pm 0,2$
	NS ^c	NS	NS	NS	NS	NS
	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	$0,19 \pm 0,02$	120 ± 4	149 ± 30	$0,44 \pm 0,02$	50 ± 2	26 ± 5
	$9 \pm 0,8$	$9 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,05$	$4,8 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$	$0,04 \pm 0,01$
	$0,5 \pm 0,06$	130 ± 5	47 ± 10	$1,18 \pm 0,04$	60 ± 2	12 ± 3
	$0,5 \pm 0,02$	82 ± 1	37 ± 7	$0,43 \pm 0,04$	53 ± 3	29 ± 7
	$0,28 \pm 0,05$	58 ± 2	48 ± 12	$0,35 \pm 0,05$	51 ± 2	34 ± 9
	$0,25 \pm 0,05$	89 ± 7	83 ± 22	$0,31 \pm 0,04$	72 ± 3	54 ± 14
	$4,76 \pm 0,27$	11 ± 1	$0,5 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,4$	8 ± 2	$0,5 \pm 0,2$

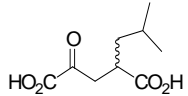
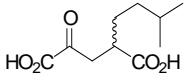
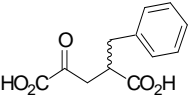
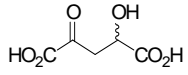
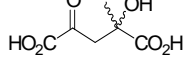
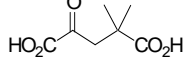
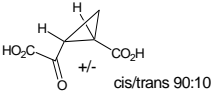
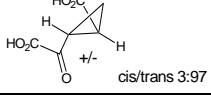
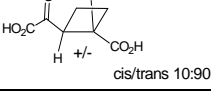
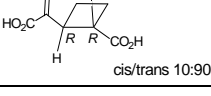
	$1,48 \pm 0,09$	62 ± 2	$9,6 \pm 1,8$	$1,9 \pm 0,1$	52 ± 6	6 ± 2
	$0,47 \pm 0,08$	84 ± 4	41 ± 10	$0,62 \pm 0,09$	42 ± 6	15 ± 4
	$0,28 \pm 0,03$	82 ± 6	68 ± 15	$0,67 \pm 0,07$	37 ± 9	13 ± 4
	3,8	70	4	<i>nd</i> ^b	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	$7,2 \pm 0,9$	20 ± 2	$0,6 \pm 0,2$	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	$8,1 \pm 1,3$	$2,8 \pm 0,4$	$0,08 \pm 0,02$	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	$3,7 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,5$	$0,41 \pm 0,09$
	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	$9,1 \pm 2,5$	$0,7 \pm 0,1$	$0,017 \pm 0,007$
	$3,9 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,03$	$3,7 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,1$	$0,18 \pm 0,03$
	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	$3,0 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,2$	$0,27 \pm 0,06$

Tableau 10 : paramètres cinétiques pour les dérivés substitués du KG.

Les 3-alkyl-KG ne sont pas de bons substrats de l'AspAT. Une faible activité a pu être mesurée uniquement avec le dérivé 3-méthyl-KG. Par contre, l'AspAT manifeste une excellente activité vis-à-vis des analogues du KG substitués en position 4.

D'une manière générale, les valeurs des paramètres cinétiques sont assez proches d'une AspAT à l'autre. De plus, dans le cas des 4-alkyl-KG, l'AspAT a montré une énantiosélectivité en faveur de l'isomère 4*R*. L'étude cinétique de la réaction de transamination réalisée indépendamment avec les 2 énantiomères du 4-méthyl-KG a montré que le coefficient d'énantiosélectivité de l'AspAT vis-à-vis de ce substrat est supérieur à 500, quelque soit l'origine de l'enzyme (tableau 10).

De plus, il est surprenant de voir que l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle en position 4 et la diminution de l'encombrement stérique au voisinage immédiat du C⁴ (série diméthyl, iPr, iBu, iPn) améliore l'activité de l'enzyme. La présence d'un groupement volumineux tel qu'un benzyle est également bien acceptée par l'AspAT.

L'introduction du groupement hydroxyle en position 4 diminue l'affinité de l'enzyme envers le substrat mais en conservant une bonne valeur de k_{cat} . De plus, l'AspAT ne montre aucune énantio-préférence vis-à-vis de ce substrat. Dans le cas de l'analogue 4-méthyl-4-hydroxy-KG, une activité plus faible et une énantio-préférence vis-à-vis de l'énantiomère (4*S*) ont été observés.

L'AspAT d'*E.coli* est active vis-à-vis des dérivés cycliques. L'enzyme semble montrer une légère préférence en faveur des isomères *cis* des composés cyclopropaniques. Dans le cas des dérivés cyclobutaniques, seul l'isomère *trans* a fait l'objet d'une étude cinétique qui a montré que l'AspAT manifeste une énantio-préférence en faveur de l'isomère (3*R*,4*R*)¹⁵.

IV.2.2 Procédé biocatalytique

Le procédé catalytique mis au point au laboratoire pour la préparation d'analogues du Glu à partir des cétoacides correspondants est présenté dans le schéma ci-dessous.

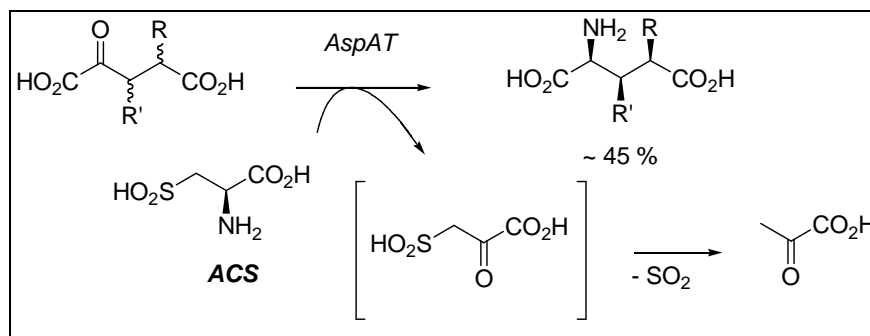


Schéma 58 : procédé de transamination pour la synthèse d'analogue du Glu.

L'ACS est utilisé comme donneur d'amine et permet de déplacer l'équilibre de transamination en formant du pyruvate et du SO_2 . Comme nous l'avons déjà expliqué dans la partie des ATs (cf chap III), l'autre avantage de l'ACS est qu'il peut être facilement séparé du produit souhaité par purification sur résine acide.

Cependant, les ions sulfites formés par hydratation du SO_2 sont à l'origine d'une inhibition de l'AspAT (Figure 34). Cette inhibition, en partie irréversible, semble due à l'addition des ions hydrogénosulfites HSO_3^- sur les intermédiaires réactionnels.

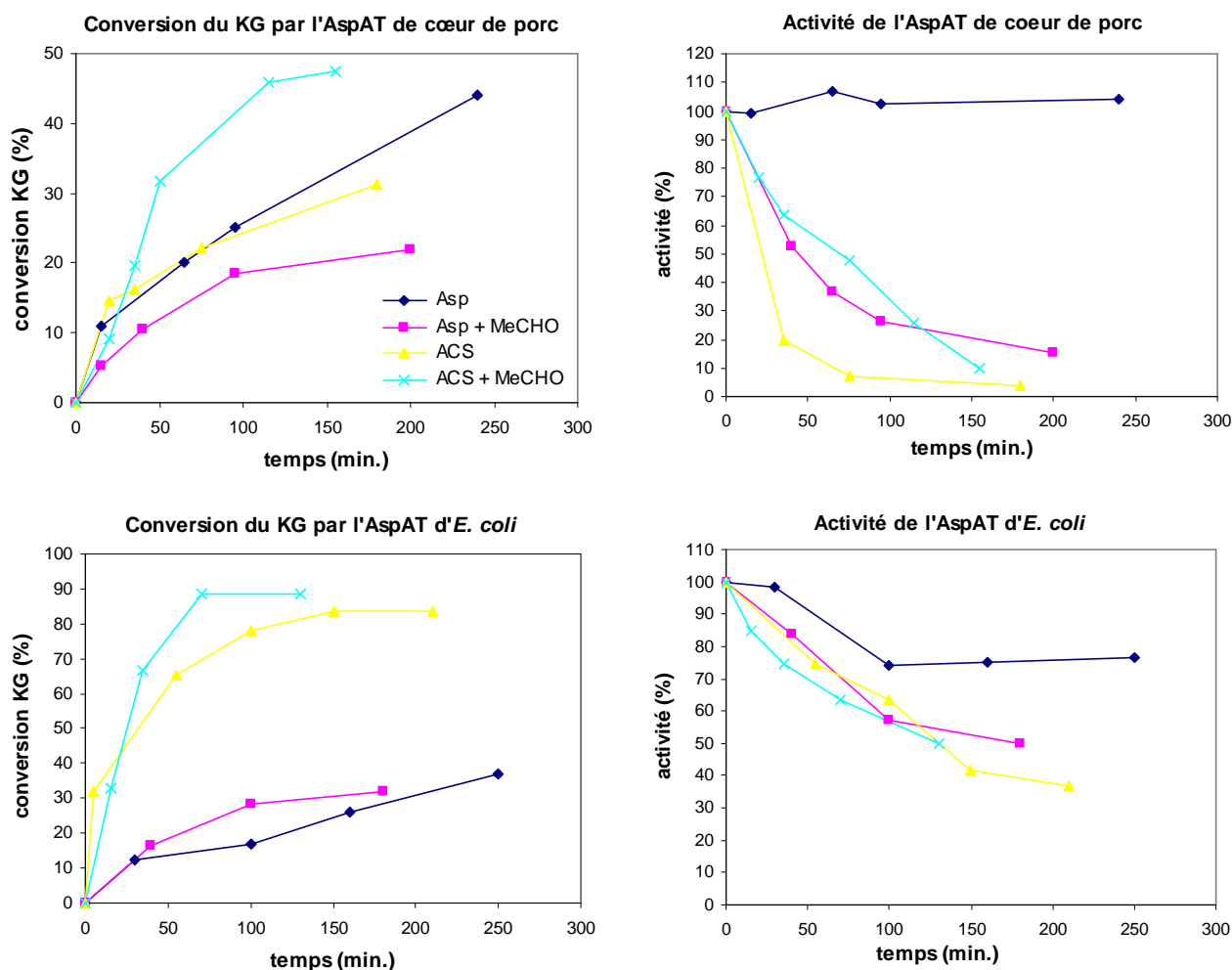


Figure 34 : Taux de conversion et stabilité de l'AspAT en fonction des conditions de synthèse.

Durant leurs travaux, S. Alaux et de M. Xian ont étudié cette inhibition et ont montré que l'ajout d'acétaldéhyde dans le milieu réactionnel diminue l'inhibition des enzymes, optimisant ainsi le temps de réaction (figure 34). Dans tous les cas, l'AspAT d'*E.coli* semble la mieux adaptée au procédé de synthèse utilisant l'ACS, puisqu'elle est plus résistante à l'inhibition par les sulfites et permet d'atteindre un taux de conversion de 45 % sans difficulté. Lors de mes travaux de thèse, nous avons choisi d'utiliser l'AspAT d'*E.coli* sans ajouter d'acétaldéhyde dans le milieu réactionnel.

IV.2.3 Synthèse des analogues du Glu en utilisant l'AspAT

L'AspAT a ainsi permis d'effectuer le dédoublement cinétique des cétoacides racémiques alkylés en position 4 : l'arrêt de la réaction à un taux de conversion voisin de 45 % a permis d'isoler les analogues du Glu de configuration L-(2,4)-*syn*¹⁴.

La purification de ces composés a été effectuée en déposant le milieu réactionnel sur une colonne de résine acide où seul l'analogue du Glu s'accroche. Une seconde chromatographie sur résine basique a permis d'obtenir une pureté généralement supérieure à 99 %.



Schéma 59 : synthèse d'analogues du Glu par transamination.

L'AspAT a également permis la synthèse du (2*S*,3*R*)-3-Méthyl-Glu¹⁴⁹, du 4-diméthyl-Glu, du (2*S*,4*S*)-4-hydroxy-4-méthyl-Glu¹³³ et des deux diastéréoisomères du dérivé 4-hydroxy-Glu¹³², séparables par chromatographie échangeuse d'ions (Figure 35).

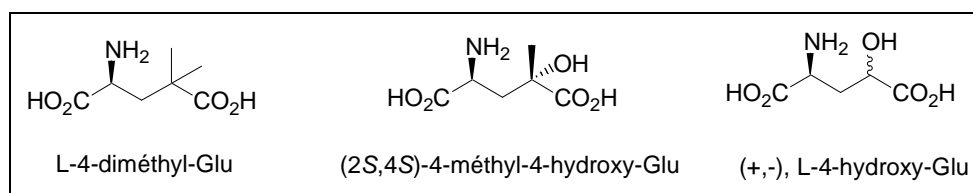


Figure 35 : obtention d'analogues de Glu en utilisant l'AspAT.

Enfin, les dérivés cyclobutaniques L-CBG-II-IV ont été synthétisés à partir des cétoacides correspondants de configuration *trans* ou *cis* (Schéma 60). Les isomères *cis* L-CBG-III et IV ont pu être séparés par chromatographie d'échange d'ions¹⁴.

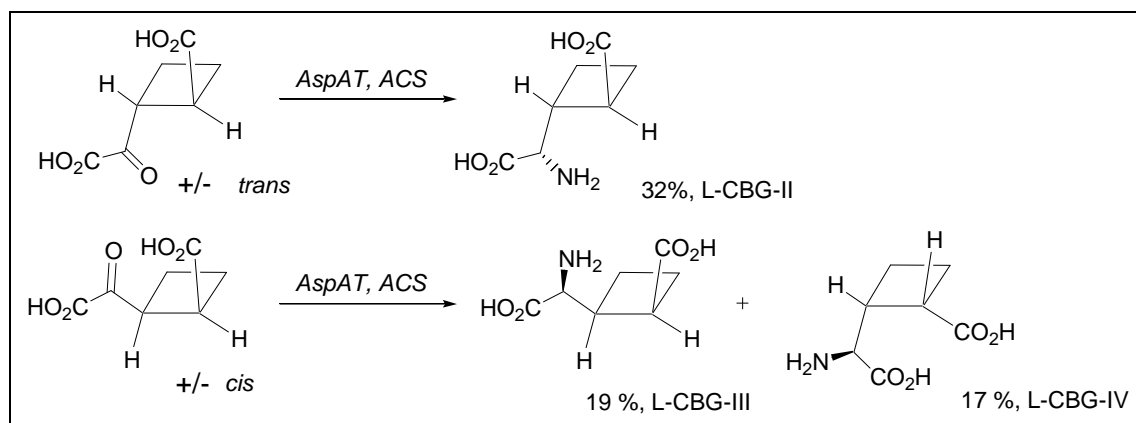


Schéma 60 : obtention des analogues du Glu L-CBG-II-IV.

L'AspAT a donc été un outil très efficace pour la préparation d'une série d'analogues de Glu substitués en particulier en position 4.

IV.3 Utilisation de la BCAT, enzyme complémentaire à l'AspAT

IV.3.1 Etude cinétique

Sachant que les substrats naturels de la BCAT comportent des groupements plus ou moins volumineux en position β (Figure 36), il n'a pas été surprenant de montrer que cette enzyme accepte les dérivés 3 et 4-alkyl-KG.

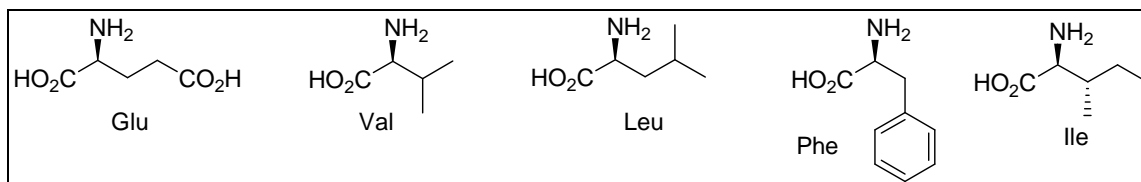


Figure 36 : substrats naturels de la BCAT.

Le tableau ci-dessous résume les paramètres cinétiques mesurés dans le cas des 3 et 4-alkyl-KG et des dérivés cycliques. Comme pour l'AspAT, les mesures de cinétiques ont été effectuées sur les mélanges racémiques des dérivés alkylés ou cycliques. De même, les k_{cat} et k_{cat}/K_m sont exprimés en pourcentage par rapport au substrat naturel qui reste le KG.

Substrat	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)	Enantio- sélectivité
	$0,23 \pm 0,04$	100 ± 3	100 ± 18	
	$0,22 \pm 0,06$	349 ± 29	242 ± 123	-
	$0,42 \pm 0,05$	205 ± 10	76 ± 33	-
	$1,9 \pm 0,4$	93 ± 12	8 ± 4	+
	$1,4 \pm 0,3$	75 ± 9	8 ± 4	+
	$0,18 \pm 0,03$	246 ± 15	211 ± 100	-
	$0,26 \pm 0,12$	220 ± 15	130 ± 83	-
	$0,68 \pm 0,06$	231 ± 12	52 ± 23	-
	$0,81 \pm 0,07$	64 ± 3	12 ± 5	-

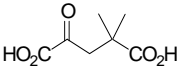
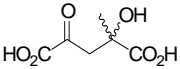
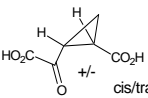
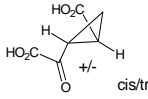
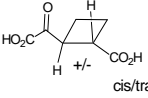
	$0,20 \pm 0,03$	166 ± 10	127 ± 57	
	$0,58 \pm 0,09$	262 ± 15	70 ± 32	-
 cis/trans 90:10	$0,57 \pm 0,09$	$1,73 \pm 0,08$	$0,5 \pm 0,2$	nd
 cis/trans 3:97	$0,34 \pm 0,08$	$4,1 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,9$	-
 cis/trans 10:90	$0,28 \pm 0,05$	$2,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,6$	+

Tableau 11 : paramètres cinétiques mesurés pour les dérivés du KG avec la BCAT d'*E.coli*. «-» représente une énantiosélectivité nulle contrairement à «+». nd : non déterminé.

La BCAT est active vis-à-vis de tous les composés présentés dans le tableau ci-contre. On observe même parfois une activité supérieure à celle menée avec le substrat naturel. Nous pouvons citer l'exemple des composés 3-Méthyl-, 4-méthyl-KG et même 4,4-diméthyl-KG qui montrent un rapport k_{cat}/K_m supérieur à 100 %. De plus, la BCAT manifeste une énantio-préférence en faveur des isomères (3*S*)-3-propyl-KG et (3*S*)-3-phenyl-KG et a donc permis le dédoublement cinétique des mélanges racémiques correspondants.

Quant aux analogues cycliques, la BCAT se montre active vis-à-vis de ces composés et offre une énantiosélectivité complémentaire à celle de l'AspAT dans le cas des dérivés cyclobutaniques de configuration *trans*. En effet, il s'avère que la BCAT montre une préférence pour l'isomère (3*S*,4*S*).

IV.3.2 Procédé biocatalytique

La stratégie de déplacement d'équilibre en utilisant l'ACS comme donneur ne peut être appliquée dans ce cas. En effet, l'ACS, tout comme l'Asp, n'est pas substrat de la BCAT. Un premier système couplant la BCAT à l'AspAT a alors été utilisé (Schéma 61).

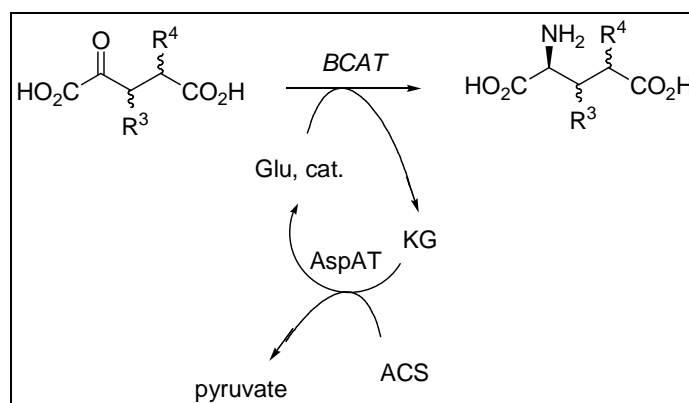


Schéma 61 : dédoublement cinétique des mélanges racémiques d'analogues du KG.

Dans ce procédé, le Glu, utilisé en quantité catalytique, joue le rôle de donneur d'amine et est régénéré par l'action de l'AspAT à partir du KG et de l'ACS, ce qui permet de déplacer l'équilibre du système. Ce procédé n'est utilisable que dans le cas où l'analogue de KG n'est pas substrat de l'AspAT et que si l'analogue du Glu produit est facilement séparable du Glu présent dans le milieu réactionnel. Cette approche a pu être utilisée dans le cas des analogues 3-propyl, 3-phényl et 4-benzyl mais pas pour les analogues 3-méthyl, 3-éthyl ou 4-méthyl. Alternativement, la Leucine a été utilisée comme substrat donneur d'amine (Schéma 62). La régénération de la Leu, dans ce cas, a été assurée en utilisant la LeuDH et en incorporant dans le milieu de l'ammoniaque et du NADH, lui-même régénéré via l'oxydation irréversible des ions HCO_2^- , catalysée par la FDH (cf ChapIII sur les ATs).

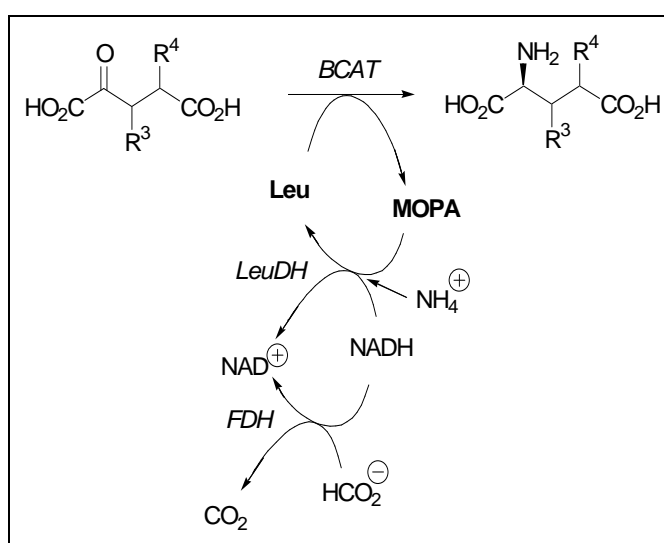


Schéma 62 : stratégie de déplacement d'équilibre en utilisant le couple Leu/LeuDH.

IV.3.3 Synthèse des analogues du Glu en utilisant la BCAT

Dans un premier temps, la BCAT a été utilisée pour synthétiser les composés (2S,3R)-3-propyl-Glu et (2S,3R)-3-phényl-Glu à partir du mélange racémique des cétoacides correspondants (Schéma 63). Les rendements obtenus sont de l'ordre de 40 % et les excès énantiomériques supérieurs à 95 %¹⁴⁹.

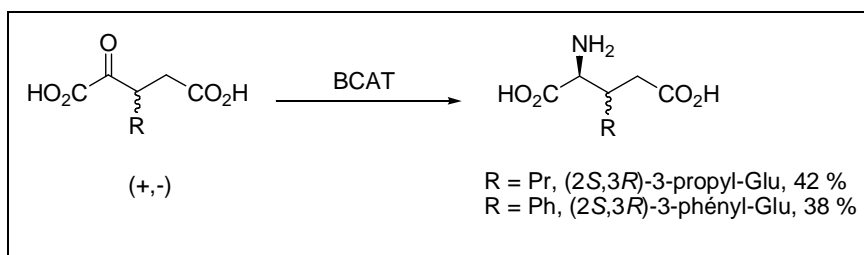


Schéma 63 : synthèse des composés (2S,3R)-3-pentyl-Glu et (2S,3R)-3-phényl-Glu.

La BCAT a également été utilisée dans un procédé en deux étapes qui a permis de préparer le (2*S*,3*S*)-3-méthyl-Glu, le (2*S*,4*S*)-4-méthyl-Glu ainsi que le (2*S*,4*R*)-4-hydroxy-4-méthyl-Glu avec de bons excès diastéréoisomériques (Schéma 64).

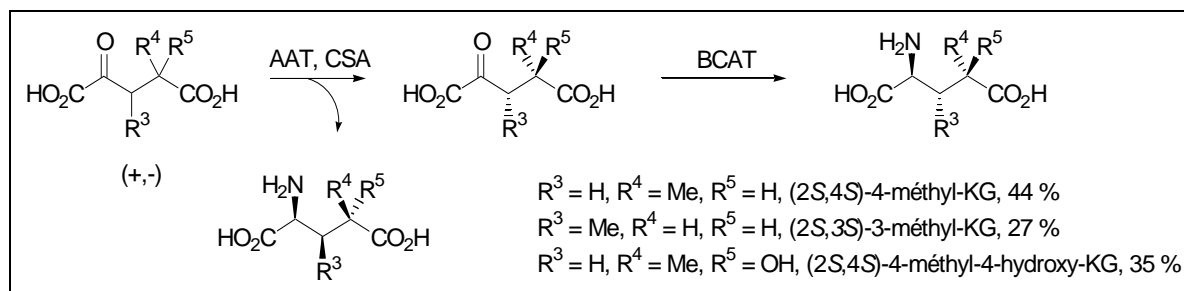


Schéma 64 : synthèse des composés (2*S*,3*S*)-3-méthyl-Glu, le (2*S*,4*S*)-4-méthyl-Glu ainsi que le (2*S*,4*R*)-4-hydroxy-4-méthyl-Glu.

Dans une première étape, le mélange racémique des cétoacides correspondant est dédoublé sous l'action de l'AspAT jusqu'à atteindre un taux de conversion supérieur à 50 %. Après adsorption du produit aminoacide sur résine acide, le cétoacide résiduel, énantiomériquement pur, a été transaminé à son tour par la BCAT. Les rendements obtenus sont compris entre 27 et 44 %.

Nous avons vu que la BCAT est également active envers les analogues cycliques avec une énantiosélectivité en faveur de l'isomère (2*S*,3*S*). Le composé L-CBG I a donc pu être préparé via le dédoublement cinétique du cétoacide *trans*, catalysé par la BCAT (Schéma 65)¹⁴⁹.

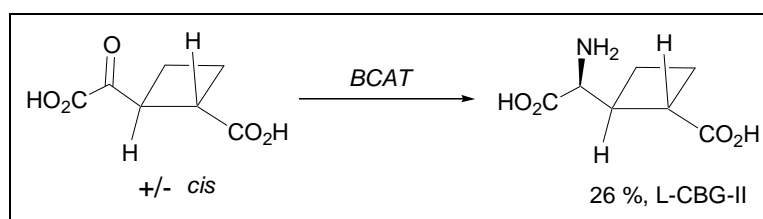


Schéma 65 : synthèse du L-CBG-I en utilisant la BCAT.

La BCAT, en offrant une spécificité de substrat complémentaire à l'AspAT, a donc permis la préparation de nouveaux analogues du Glu.

Projet de Recherche

Durant ma thèse au sein de l'équipe Bioconversion du SEESIB de Clermont-Ferrand, sous la tutelle du Pr. Jean Bolte et du Dr. Thierry Gefflaut, j'ai eu pour mission d'élargir les études de spécificité de substrats de l'AspAT et de la BCAT à de nouveaux analogues du KG afin de préparer une variété d'analogues du Glu (Schéma 66). Comme nous l'avons vu dans la première partie, ces composés sont des ligands sélectifs potentiels des différents récepteurs et transporteurs du système glutamatergique. L'évaluation des propriétés pharmacologiques des analogues du Glu a donc été envisagée dans le cadre d'une collaboration.

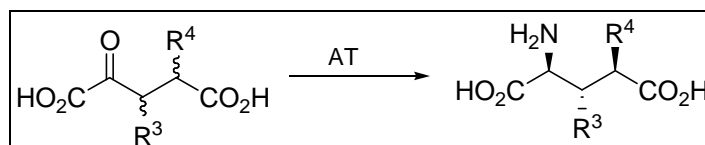


Schéma 66 : synthèse d'analogues du Glu par transamination.

Nous avons essentiellement envisagé l'élaboration de nouveaux analogues du Glu substitués par des groupements fonctionnalisés en position 4 et incluant les fonctions alcool, acide, éther, amide et ester (Figure 37). En effet, nous avons vu que plusieurs analogues du Glu substitués en position 4 par divers groupements hydrocarbonés ont montré des sélectivités vis-à-vis des différents récepteurs et transporteurs du système glutamatergique. L'introduction d'hétéroatomes sur les substituants de la chaîne du Glu permet d'envisager des interactions supplémentaires au niveau des sites de liaison et pourrait donc permettre la mise au point de nouveaux ligands sélectifs. D'autre part, les fonctions ester et amide offre l'opportunité de générer assez facilement une grande variété structurale en modifiant la nature des substituants des fonctions ester (R) et amide (R et R').

Nous avons également envisagé de synthétiser des analogues phosphorylés comme l'AP4 qui montre une sélectivité marquée pour les mGluRs du groupe III. Nous avons voulu savoir si notre approche chimio-enzymatique permettait d'accéder à ce type d'analogues du Glu. Enfin, nous nous sommes aussi fixés comme objectif la préparation d'un nouvel analogue contraint incluant un cycle β -lactame : cette structure a été définie en collaboration avec le Dr. L. Bunch. (Figure 37). En effet, le L-CBG II, dérivé cyclobutanique du Glu préparé au laboratoire, a montré une activité très intéressante en tant qu'agoniste sélectif des mGluRs II. Cette sélectivité offre un potentiel thérapeutique intéressant, comme nous l'avons évoqué dans le cas des analogues LY354740 (cf chap I). Le Dr. Bunch a par ailleurs effectué une étude de modélisation moléculaire qui lui a permis de supposer que l'introduction de la fonction amide au niveau du cycle pourrait permettre d'améliorer l'efficacité et la sélectivité d'action par rapport au dérivé cyclobutanique.

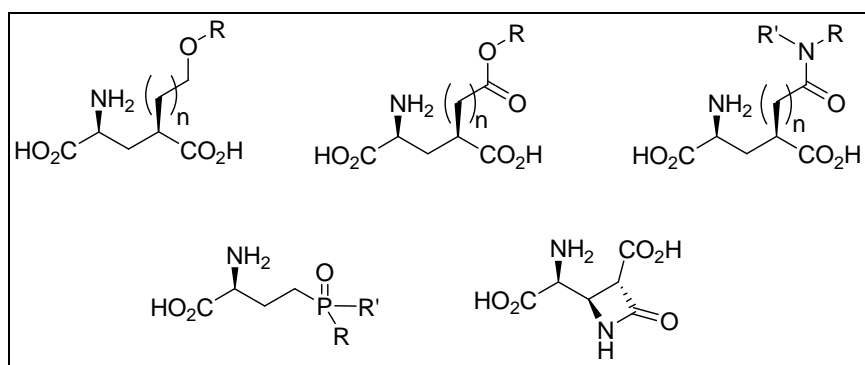


Figure 37 : structures des nouveaux analogues du Glu dont la synthèse a été envisagée dans ce travail.

Afin d'accéder à la plupart de ces analogues du Glu et à leurs précurseurs c'est à dire aux analogues du KG, nous avons envisagé de développer l'approche générale basée sur la condensation de Michael et l'oxydation d'acétate d'énol, méthode présentée précédemment.

D'autre part, nous avons aussi souhaité introduire un groupement azoture en bout de chaîne du substituant en position 4 afin d'effectuer des cycloadditions [2+3] avec divers alcynes. Cette approche de type « Click Chemistry » offre un accès potentiel à une nouvelle librairie d'analogues du Glu obtenus à partir d'un seul et même acide aminé (Schéma 67).

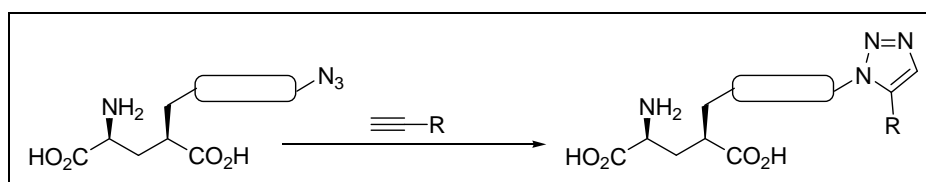


Schéma 67 : cycloaddition entre un analogue du Glu et un alcyne.

Dans la partie bibliographique portant sur la pharmacologie des GluRs, nous avons vu que ces récepteurs comportent un site de fixation du Glu et d'autres sites de liaison d'agonistes ou d'antagonistes non compétitifs du Glu. Ainsi, la préparation de bi-ligands reliant un analogue du Glu à un autre ligand non compétitif serait un moyen d'obtenir une grande sélectivité d'action et de moduler la réponse des récepteurs et ainsi diminuer les effets secondaires. Cette approche nous a paru très intéressante notamment dans le cas des NMDARs. On peut en effet imaginer une molécule de Glu reliée par l'intermédiaire d'une chaîne carbonée à un autre ligand tel qu'une amine, qui bloquerait les canaux ioniques des iGluRs ou qui se fixerait sur d'autres sites tels que celui de la glycine (Figure 38).

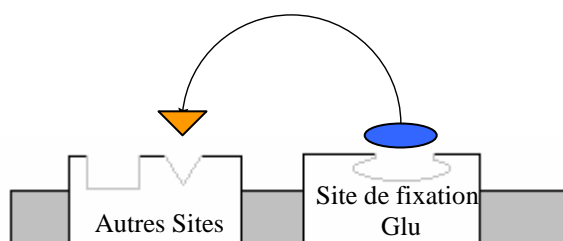


Figure 38 : bi-ligands interagissant sur différents sites des GluRs.

Des bi-ligands comportant 2 motifs Glu seraient aussi très intéressants pour interagir au niveau des récepteurs oligomériques comportant plusieurs sous-unités fixant le Glu.

Au cours de ce travail, nous avons aussi envisagé d'allonger la chaîne en position 4 du Glu, afin de tester la tolérance des ATs et d'orienter notre travail vers d'éventuels substrats immobilisés utilisables dans un procédé de transamination à grande échelle : un glutamate, fixé sur un support solide ou polymérique via une substitution du carbone 4, pourrait être substrat d'une transaminase comme l'AspAT ou encore la BCAT. Un polymère de type PEG greffé avec le Glu pourrait, par exemple, être préparé à partir d'analogues fonctionnalisés. L'idée est donc de « piéger » le substrat donneur immobilisé et l'AT à l'intérieur d'une membrane semi-perméable et d'y faire passer un courant continu en cétoacide (substrat accepteur). A la sortie de ce réacteur, une colonne de résine fortement acide permettrait d'accrocher le produit aminé de la transamination et ainsi de déplacer l'équilibre de la réaction enzymatique. En sortie de colonne, le flux en cétoacide repart dans le réacteur membranaire après ajustement du pH si besoin (Schéma 68). Le donneur immobilisé serait régénéré dans une étape indépendante en utilisant un donneur peu coûteux comme l'Asp, le Glu ou l'ACS.

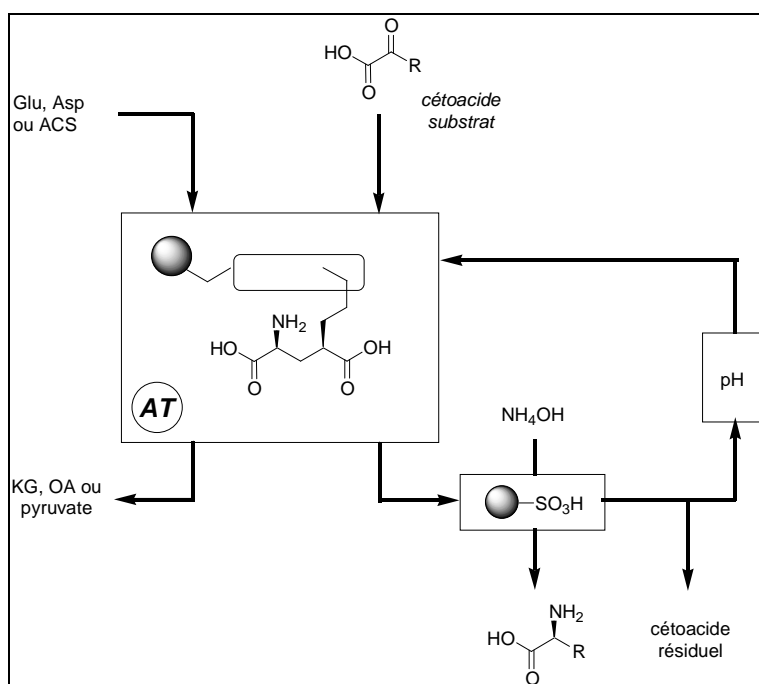


Schéma 68 : modèle de réacteur fonctionnant pour la préparation d'analogues du Glu à l'échelle industrielle.

Dans la littérature, nous trouvons relativement peu d'exemples de synthèse enzymatique où le substrat est fixé sur un support solide, ou sur un polymère soluble dans l'eau tel que le PEG. Les applications les plus récentes concernent la synthèse peptidique à l'aide de protéases^{151,152} et la préparation d'oligonucléotides à l'aide de glycosyltransférases^{153,154,155,156}. Par contre, de nombreux

¹⁵¹ X. Wu, X. Bu, K. M. Wong, Z. Guo, *Org. Lett.*, **2003**, 1749-1752.

¹⁵² R. U. Ulijn, B. Baragana, P. J. Halling, S. L. Flitsch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 10988-10989.

¹⁵³ C. Schmitz, M. T. Reetz, *Org. Lett.*, **1999**, 1729-1731.

travaux ont été effectués sur le cofacteur NAD. En effet, l'utilisation de déshydrogénases pour la production d'alcools ou d'acides chiraux à l'échelle industrielle dans des procédés en continu implique que le cofacteur soit immobilisé ou modifié pour rester confiné à l'intérieur d'un réacteur à membrane^{157,158}. L'activité de l'enzyme avec le NAD modifié par une chaîne PEG fixée au niveau du cycle adénine (qui interfère peu avec les enzymes) est conservée, avec cependant une augmentation du K_m . La problématique que nous abordons avec le KG ou le Glu immobilisé est assez semblable : si le mode de fixation entraîne peu de perte d'activité, le Glu immobilisé pourrait donc servir de donneur dans un réacteur membranaire, comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe précédent. Ce « Glu immobilisé » pourrait par ailleurs présenter d'autres applications dans le domaine de la chromatographie d'affinité.

En parallèle de ce travail de synthèse, un projet de modélisation moléculaire a porté sur l'étude du site actif de l'AspAT d'*E.coli*. Cette étude a eu pour premier objectif d'expliquer et de comprendre l'énantiosélectivité et la spécificité de substrat de l'enzyme. D'autre part, un autre but était de définir un modèle de prédiction d'activité de l'enzyme, nous aidant à orienter nos travaux de synthèse vers des substrats potentiels de l'AspAT. Ce travail est présenté dans la seconde partie du mémoire.

¹⁵⁴ G. Fanny, S. D. Jason, K. J. Jensen, T. R. Owen, M. Debra, *Carbohydrate Research*, **2003**, 1951-1960.

¹⁵⁵ K. Yamada, S-I. Nishimura, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 9493-9496.

¹⁵⁶ M. Schuster, P. Wang, J. C. Paulson, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 1135-1136.

¹⁵⁷ M-O. Moussan, K. Mosbach, *Methods in enzymol.*, **1987**, 3-8.

¹⁵⁸ D. Pasta, G. Carrea, N. Gaggero, G. Grogan, A. Willetto, *Biotechnol. Lett.*, **1995**, 1123-1128.

Résultats et Discussion

Introduction

Dans une première partie, nous exposerons les travaux portant sur l'élaboration d'analogues du KG fonctionnalisés en position 4. Nous décrirons également la synthèse des dérivés phosphoniques et hétérocycliques effectuée au cours de cette étude.

Un second chapitre sera consacré à l'étude de la réaction de transamination catalysée par l'AspAT et la BCAT, enzymes disponibles au laboratoire. Nous ferons ensuite une description du procédé catalytique mis en jeu pour la synthèse de nouveaux analogues du Glu obtenus à partir des analogues du KG, substrats de l'AspAT.

Dans un quatrième chapitre, est présentée la synthèse d'une nouvelle série d'analogues du Glu effectuée à partir de la cycloaddition d'un azoture avec un alcyne. Dans cette étude, la synthèse de substrats immobilisés et de bi-ligands a été envisagée.

Enfin, l'ultime chapitre est consacré à l'interprétation des tests biologiques effectués sur les EAATs et les GluRs.

Chapitre I Synthèse des analogues du KG fonctionnalisés en 4

I.1 Utilisation de la condensation de Michael et de l'oxydation d'acétates d'énol

Nous avons vu précédemment que la méthode utilisant le réarrangement de Claisen-Johnson est une méthode très efficace pour la préparation d'analogues du KG. Cependant, la synthèse des orthoesters comprenant des groupements fonctionnalisés est probablement limitante. Les acrylates substitués par des groupements fonctionnels étant plus facilement accessibles, la méthode basée sur la condensation de Michael nous est apparue comme un choix judicieux pour la préparation de nouveaux analogues du KG fonctionnalisés en position 4 (Schéma 69).

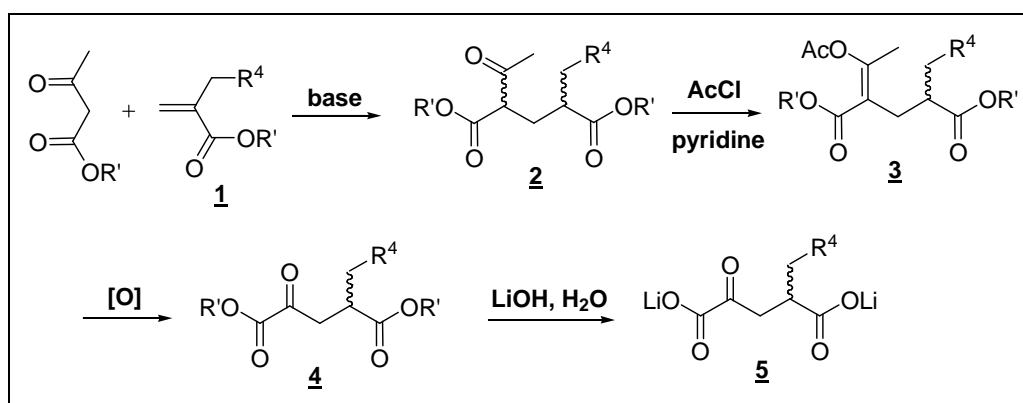


Schéma 69 : méthode appliquée pour la synthèse d'analogues de KG fonctionnalisés en position 4.

Comme nous l'avons vu, cette méthode comporte quatre étapes que nous décrirons une par une dans les paragraphes suivants, après avoir décrit la synthèse des acrylates du type 1.

I.1.1 Préparation des acrylates 1

A. Préparation des α-alkoxyméthyl-acrylates

Les composés 1a, 1b et 1c ont été obtenus à partir du composé 7, préparé en deux étapes à partir du phosphonoacétate de triméthyle comme le montre le schéma ci-après.

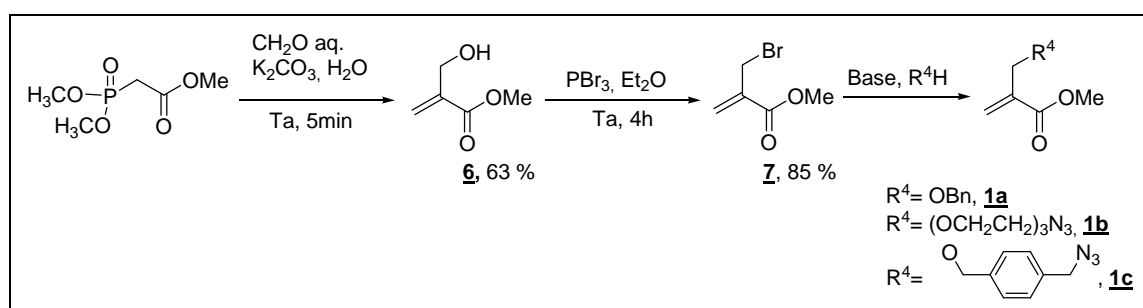


Schéma 70 : synthèse d'α-alkoxyméthyl-acrylates.

La première réaction a été effectuée selon le protocole de Vilieras et al.¹⁵⁹ avec un rendement de 63 %. Elle implique une double addition nucléophile du phosphonoacétate de triméthyle sur 2 molécules de formaldéhyde, avant l'étape d'élimination. Le composé **6** a tendance à polymériser dans le milieu réactionnel, ce qui limite le rendement. L'ajout d'un stabilisant tel que l'hydroquinone a permis de limiter la polymérisation lors du traitement de la réaction et de la purification par distillation de **6**. Une bromation classique conduit au composé **7** avec un rendement de 85 %.

➤ Obtention de l'acrylate **1a** à partir de **7**

L'étape de substitution nucléophile a été mise au point en faisant varier la base, le solvant, le nombre d'équivalent d'alcool benzylique (BnOH), le temps de réaction ainsi que la température à laquelle la réaction a été réalisée (Tableau 12).

$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CO}_2\text{Me})\text{CH}_2\text{Br} + \text{BnOH} \xrightarrow{\text{Base}} \text{CH}_2=\text{C}(\text{CO}_2\text{Me})\text{CH}_2\text{OBn}$						
entrées	Base et nombre d'équivalent	BnOH Nombre d'équivalent	solvant	T (°C)	Temps de réaction (h)	Rendement (%)
1	Pyridine (30 eq.)	2	pyridine	80	48	traces
2	Diisopropyl-éthyl-amine d'éthyle (1,5 eq.)	2	Et ₂ O	45	24	50
3	NEt ₃ (1,5 eq.)	30	BnOH	Ta	24	0
4	NEt ₃ (1,5 eq.)	2	Et ₂ O	Ta	24	25
5	NEt ₃ (1,5 eq.)	2	Et ₂ O	45	21	22
6	NEt ₃ (1,5 eq.)	2	toluène	110	21	62
7	Na (1,0 eq.)	2	Et ₂ O	Ta	23	59
8	DABCO (1,5 eq.)	2	Et ₂ O	45	26	50
9	DABCO (1,5 eq.)	2	Et ₂ O	70	34	80
10	DABCO (1,5 eq.)	2	Et ₂ O + 10 % DMSO	70	48	33

Tableau 12 : mis au point de la réaction pour former **1a** à partir de **8**.

¹⁵⁹ J. Vilieras, M. Rambaud, *Organic Synthesis*, CV 8, 265.

Cette étude a montré que le DABCO est la base la plus appropriée pour effectuer la substitution du brome par le BnOH (entrée 9). En effet, nous n'observons aucune évolution de la réaction en présence de pyridine (entrée 1). L'utilisation de diisopropyléthylamine ou de triéthylamine conduit à des rendements faibles (entrées 2-6). C'est seulement en chauffant à 110 °C dans le toluène, en présence de triéthylamine, qu'on atteint un rendement de 62 % (entrée 6).

Une méthode décrite dans la littérature¹⁶⁰ qui consiste à générer l'alcoolate de sodium *in situ*, présente également un rendement de 50 % (entrée 7). Cette méthode pose le problème de transésterification inévitable en présence d'alcoolate.

Le DABCO agit vraisemblablement via la formation d'un ammonium intermédiaire (Schéma 71). En effet, dès l'ajout du dérivé bromé en solution, cette intermédiaire se forme et précipite instantanément dans l'Et₂O sous la forme d'un solide blanc qui peut être identifié en RMN.

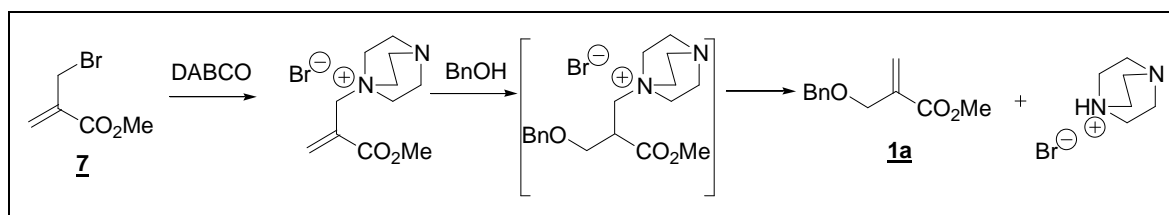


Schéma 71 : catalyse par le DABCO pour la synthèse de l'acrylate **1a**.

Au fur et à mesure de l'avancement de la réaction, l'analyse RMN du solide présent dans le milieu réactionnel a permis d'observer la disparition de l'ammonium intermédiaire et l'apparition du sel d'ammonium du DABCO qui présente un seul signal pour le groupement méthylène. L'ajout de 10 % de DMSO améliore la solubilité de l'ammonium intermédiaire mais ralentit la réaction (entrée 10).

➤ Obtention des acrylates **1b** et **1c** à partir de **7**

L'acrylate **1b** n'a pas pu être préparé suivant la méthode précédente qui utilise le DABCO comme base. Au bout de 3 jours de chauffage à 70 °C, on isole uniquement l'intermédiaire ammonium auquel s'est additionné l'alcool **8** (Schéma 72).

¹⁶⁰ S. Vassiliou, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 2610.

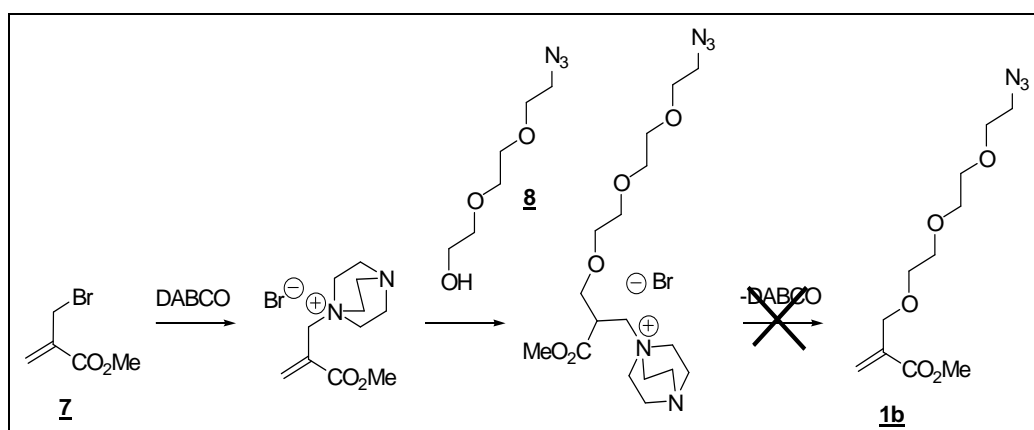


Schéma 72 : échec de la synthèse de l'acrylate **1b** en utilisant le DABCO comme base.

D'autres essais ont été effectués en utilisant l'alcoolate de sodium du composé **8** généré *in situ* soit par addition de sodium dans Et₂O, soit en présence de NaH dans le THF (entrées 2-3, Tableau 13).

entrées	Base et nombre d'équivalent	Alcool 8 Nombre d'équivalent	solvants	T (°C)	Temps de réaction (h)	Rendement (%)
1	DABCO (1,5eq.)	1,1	THF	70	72	0
2	Na (1,0 éq.)	1,0	Et ₂ O	45	24	0
3	NaH (1,0 éq.)	1,0	THF	Ta	8	73

Tableau 13 : mis au point de la réaction pour former **1b**.

Seule l'utilisation de NaH comme base a permis la synthèse de l'acrylate **1b**. Au bout de 8h d'agitation à Ta, l'acrylate souhaité est obtenu avec un rendement de 73 %. Notons que l'addition de l'alcoolate sur le dérivé bromé **7** doit se faire très lentement pour éviter la réaction de transestérification.

Cette méthode a également été adoptée pour la préparation de l'acrylate **1c** qui n'a pas non plus été obtenu en utilisant le DABCO. La transestérification reste inévitable dans ce cas aussi mais le produit est isolé avec un bon rendement de 77 %.

En résumé, l'utilisation du DABCO en tant que base est efficace pour la synthèse de l'acrylate **1a**, alors que l'utilisation du NaH semble être une méthode plus générale assurant la préparation des composés **1b** et **1c** avec des rendements corrects (Schéma 73).

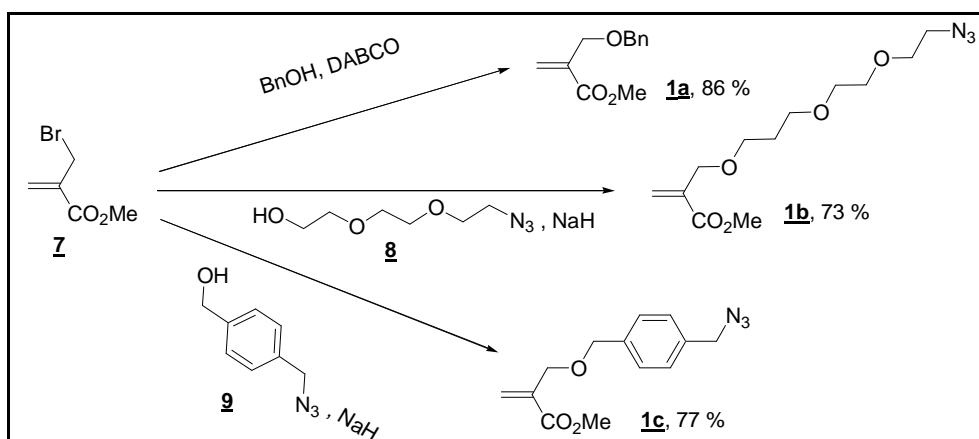


Schéma 73 : résumé des expériences qui ont permis de synthétiser les acrylates **1a**, **1b** et **1c** avec de bons rendements.

➤ Synthèse des alcools **8** et **9**

Plusieurs méthodes de synthèse du composé **8** sont décrites dans la littérature et présentées dans le tableau ci-dessous.

$\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X} \xrightarrow[\text{catalyseur, solvant, T}]{\text{NaN}_3} \text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$							
entrées	X	catalyseur	solvants	T (°C)	Temps de réaction (h)	Rendement (%)	références
1	OTs	NaI	DMF	80	7	65	(p. Sinay et al.) ¹⁶¹
2	OMs	/	EtOH/H ₂ O	80	3	97	(M. Hashimoto et al.) ¹⁶²
3	Cl	NaI	EtOH	70	24	96	(U. K. Saha et al.) ¹⁶³
4	Cl	NaI	EtOH	70	120	62	(P. C. N. Rensen et al.) ¹⁶⁴
5	Cl	NaI	DMF	75	4	85	(S. S. Lyer et al.) ¹⁶⁵

Tableau 14 : données de la littérature pour la synthèse de l'alcool **9**.

¹⁶¹ P. H. Amvam-Zollo, P. Siany, *Carbohydrate Res.*, **1986**, 150, 199-212.

¹⁶² M. Hashimoto, Y. Liu, K. Fang, H-Y. Li, G. Campiani, K. Nakanishi, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 1181-1194.

¹⁶³ R. Roy, U. K. Saha, *Chem. Commun.*, **1996**, 201-202.

¹⁶⁴ P. C. N. Rensen, S. H. Van Leeuwen, L. A. J. M. Sliedregt, T. J. C. Van Berkel, E. A. L. Biessen, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 5798-5808.

¹⁶⁵ S. S. Lyer, A. S. Anderson, S. Reed, B. Swanson, J. G. Schmidt., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 4285-4288.

Toutes ces méthodes utilisent l'azoture de sodium comme réactif et la plupart d'entre elles, utilisent NaI en tant que catalyseur. Nous avons préféré l'éthanol au DMF (solvant toxique et difficile à éliminer) comme solvant et le triéthylèneglycol monochloré, commercial, comme produit de départ (Schéma 74).

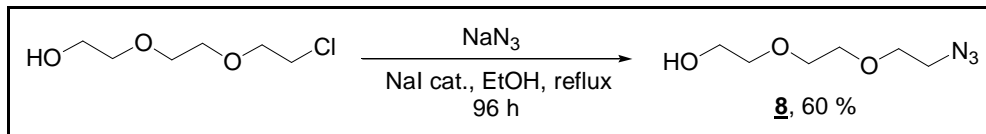


Schéma 74 : synthèse de l'azoture **8**.

Contrairement aux données de la littérature (entrée 3), au bout de 24h, il reste du produit de départ, largement majoritaire dans le milieu réactionnel. C'est seulement au bout de 5 jours que la réaction paraît totale. Le composé **8** est alors obtenu avec un rendement de 60 % après purification.

Une autre réaction a été effectuée, sans catalyseur et dans l'eau¹⁶⁶ (Schéma 75).

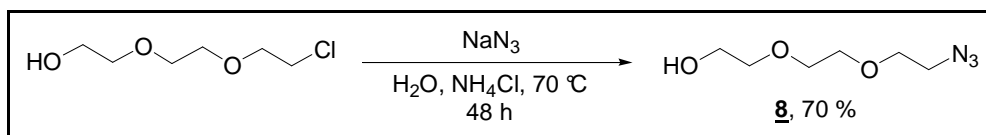


Schéma 75 : synthèse de l'alcool **8**.

Un rendement de 70 % a été atteint au bout de 48 h de chauffage à 70 °C. Le produit final est facilement extrait avec AcOEt et isolé avec une bonne pureté (> 95 %) d'après la RMN. Cette méthode s'est aussi avérée très efficace pour la synthèse de l'alcool **9** isolé avec un rendement de 88 % au bout de 6h de chauffage à 70 °C (Schéma 76).

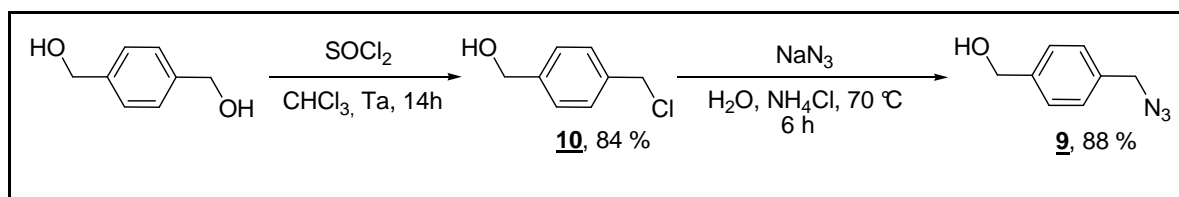


Schéma 76 : synthèse de l'alcool **10**.

Le dérivé chloré de départ **10** est commercial chez Sigma-Aldrich mais il est coûteux. Il peut être cependant facilement obtenu à partir du 1,4-dihydroxyméthylbenzène par une monochloration en présence de SOCl_2 ¹⁶⁷ avec un coût global moins important.

¹⁶⁶ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021.

¹⁶⁷ M. E. Pierce, G. D. Harris, Q. Islam, L. A. Radesca, L. Storace, R. E. Waltermire, E. Wat, P. K. Jadav, G. C. Hemmett, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 444-450.

B. Préparation d'acrylates de type diester

Le choix des acrylates comportant une fonction esters supplémentaire est important pour la synthèse des cétoacides fonctionnalisés (Schéma 77). En effet, il est nécessaire de pouvoir différencier les deux fonctions esters des acrylates **1e-h** pour effectuer une déprotection sélective du cétoester de type **4**. Ainsi, il est possible de conserver la fonction ester méthylique du substituant en position 4 (composés **5e** et **5g**) ou encore de préparer le monoacide **4i** qui pourra être engagé dans des réactions de couplage régiosélectives pour préparer diverses amides de type **5k-l** (Schéma 77).

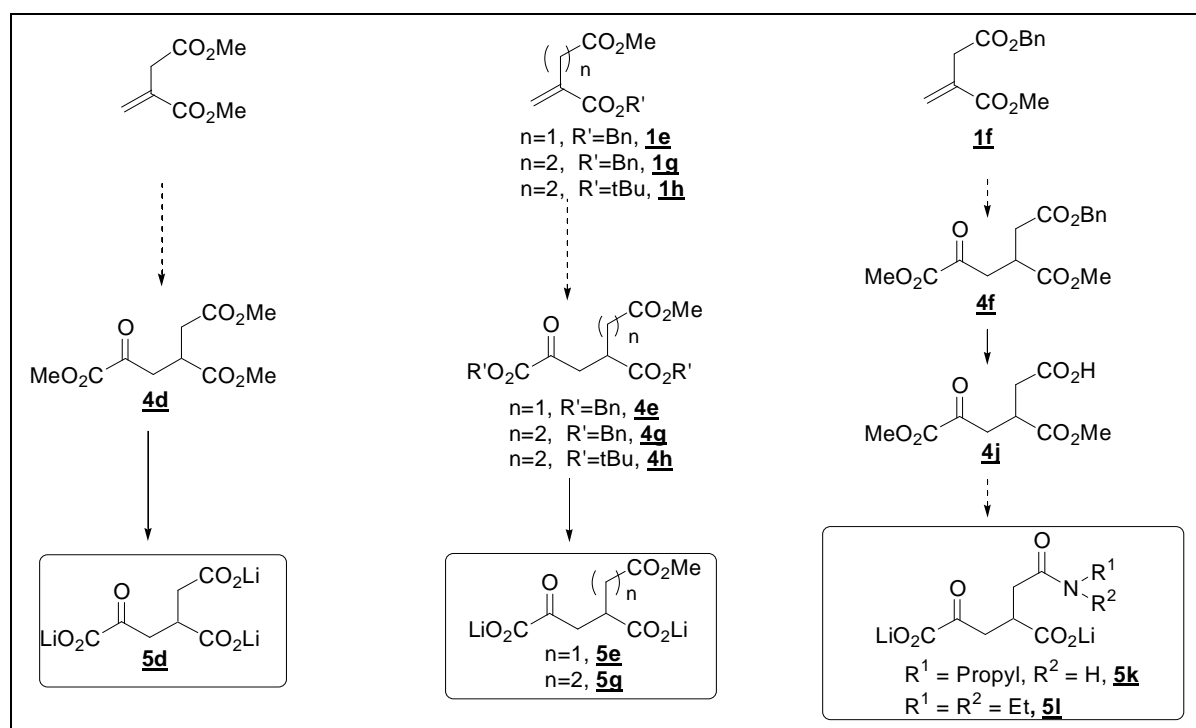


Schéma 77 : stratégie utilisée pour synthétiser des acrylates substitués par des esters.

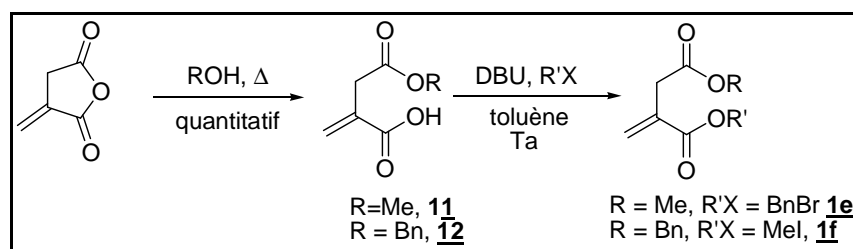
➤ Synthèse des itaconates **1e** et **1f**

Contrairement au diméthylitaconate qui est commercial, les composés **1e** et **1f** ont été préparés en 2 étapes via l'ouverture régiosélective de l'anhydride itaconique.

Ainsi, l'attaque d'un alcool ROH, utilisé comme solvant de la réaction, se fait majoritairement sur le groupement carbonyle non conjugué et qui est le plus électrophile, formant ainsi les monoacides **11**¹⁶⁸ et **12**¹⁶⁹ (Schéma 78).

¹⁶⁸ J. J. Talley, *EP 0 561 758*, **1993**.

¹⁶⁹ C. H. Hassal, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1984**, 155-164.

Schéma 78 : synthèse des acrylates **1e** et **1f**.

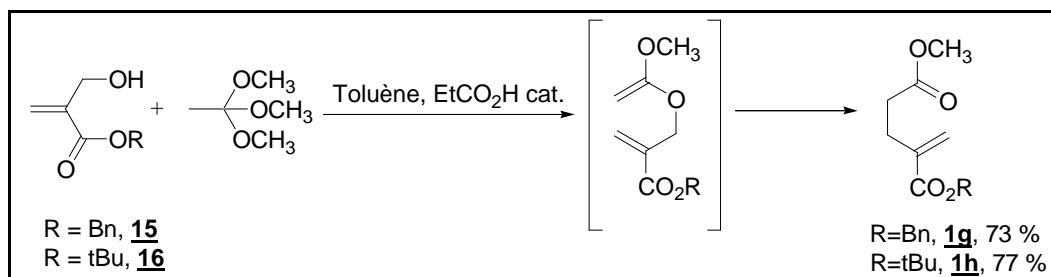
La régiosélectivité de cette réaction est cependant limitée puisque nous avons obtenu un mélange 90/10 de deux isomères dans les deux cas. L'estérification de l'acide a été réalisée sur ces mélanges. La réaction d'estérification a été réalisée en présence de DBU (1,8 diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène) et d'un halogénure d'alkyle R'X dans le toluène. Les rendements obtenus sont convenables (Tableau 15). Ici encore, les composés **1e** et **1f** n'ont pas pu être séparés de leurs isomères et les mélanges ont été engagés dans la réaction suivante (condensation de Michael).

entrées	R	monoacide	R'X	Temps de réaction	Rendement (%)	Acrylate 1
1	CH ₃	11	BnBr	70 min	95	1e
2	Bn	12	CH ₃ I	24 h	68	1f

Tableau 15 : synthèse des acrylates **1e** et **1f**.

C. Préparation des 2-alkylidène-glutarates **1g** et **1h**

Les composés **1g** et **1h** possèdent un groupement CH₂ supplémentaire en position 4 par rapport aux acrylates **1e** et **1f**. Ils ont été préparés par la condensation de Claisen-Johnson (Schéma 79). Comme nous l'avons vu, cette réaction permet de former des acétals de cétène qui se réarrangent en alkylidène-glutarate. Les composés **1g** et **1h** ont ainsi été synthétisés à partir de l'orthoacétate de triméthyle et des composés **15** et **16** avec des rendements de l'ordre de 70 %. La distillation lente du mélange azeotropique formé entre le toluène (solvant) et le méthanol (produit au cours de la réaction) offre l'avantage de déplacer l'équilibre réactionnel en faveur de l'acétal de cétène.

Schéma 79 : réarrangement de Claisen-Johnson pour la préparation des acrylates **1g** et **1h**.

Les alcools allyliques **15**¹⁷⁰ et **16**¹⁷¹ ont, quant à eux, été synthétisés selon la réaction de Wittig-Horner décrite précédemment dans le cas du composé **6**. Les phosphonoacétates ont été obtenus à partir du bromoacétate de benzyle dans le cas du composé **13**¹⁷² et à partir de l'acide 2-(diéthoxyphosphonol)acétique pour le composé **14**¹⁷³ (Schéma 80). Notons que le composé **14** n'a pas été purifié avant d'être engagé dans la réaction suivante.

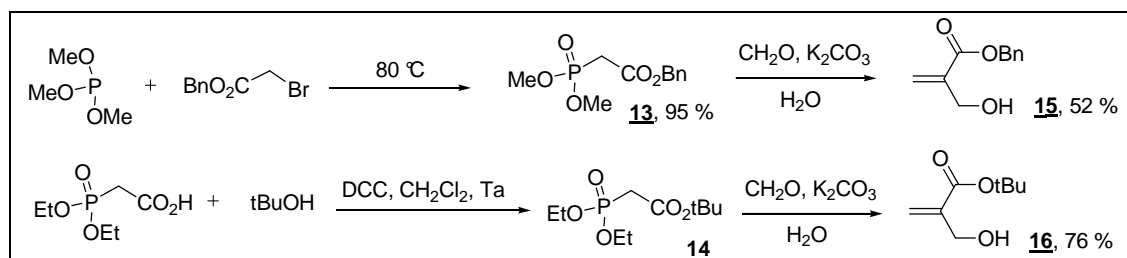


Schéma 80 : synthèse des alcools allyliques **15** et **16**.

I.1.2 Réaction de Michael : préparation des 2-acétyl-glutarate **2**

La condensation d'un acétoacétate d'alkyle sur un acrylate substitué permet de former un β -cétoester du type **2** présentant le squelette carboné du KG. Le tableau ci-après présente les rendements obtenus qui varient selon le type d'acrylates **1** et d'acétoacétate utilisés.

entrées	R'	acrylate 1	R ⁴	solvant	temps réaction (h)	rendement (%)	produit 2
1	CH ₃	1a	OBn	MeOH	16	95	2a
2	CH ₃	1b	(OCH ₂ CH ₂) ₃ N ₃	MeOH	6	73	2b
3	CH ₃	1c		MeOH	16	39	2c
4	CH ₃	1d	CO ₂ CH ₃	MeOH	2	78	2d
5	Bn	1e	CO ₂ CH ₃	DMSO	1	66	2e
6	Bn	1g	CH ₂ CO ₂ CH ₃	DMSO	7	74	2g
7	tBu	1h	CH ₂ CO ₂ CH ₃	DMSO	24	17	2h
8	CH ₃	1f	CO ₂ Bn	DMSO	1	66	2f

Tableau 16 : données expérimentales pour la synthèse du β -cétoester **2**.

¹⁷⁰ O'Leary et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 47, 11519-11533.

¹⁷¹ J. Ishihara, J. Miyakawa, T. Tsujimoto, A. Murai, *SYNLETT*, **1997**, 1417-1419.

¹⁷² C. J. Bradley, G. Buchi, *J. Org. Chem.*, **1976**, 699-701.

¹⁷³ R. Shelkov, M. Nahmany, A. Melman, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 8975-8982.

Les composés **2**, présentant un groupement fonctionnalisé de type éther (entrées 1-3) ou ester (entrée 4-7), sont obtenus avec des rendements compris entre 66 % et 95 %. Il existe cependant deux exceptions pour lesquels le rendement n'est que de 39 et 17 % (entrées 3 et 7). La synthèse du composé **2c** n'a été effectuée qu'une seule fois et sur petite quantité. Par manque de temps, nous n'avons pas pu optimiser ce rendement. Dans le cas du composé **2h** (entrée 7), les réactifs comportant des esters *tert*-butyliques réagissent difficilement dans ces conditions, sans doute à cause de l'encombrement stérique de ses groupements. Au bout de 24h, la réaction reste incomplète et on observe la formation d'un produit de décarboxylation du composé **2h** correspondant à la coupure de la liaison C₁.C₂ par une réaction de type rétro-Claisen.

Ici encore, les composés **2d** et **2e** n'ont pas pu être séparés de leurs isomères respectifs. Dans les deux cas, nous obtenons un mélange d'isomères 90/10, dans lesquels les composés **2d** et **2e** restent majoritaires.

Dans tous les cas, KF a été utilisé en tant que base douce, limitant ainsi les réactions secondaires telles que les réactions de rétro-Claisen.

Dans le cas des β -cétoesters comportant une chaîne éthérée en position 4 (entrées 1-3), la condensation de l'acétoacétate de méthyle sur divers acrylates substitués a été effectuée dans le MeOH. Pour la synthèse des composés **2e-h**, nous avons utilisé le DMSO pour éviter les réactions de transestérifications. Le chauffage modéré du milieu réactionnel (~65°C) a par ailleurs permis d'éviter les réactions de décarboxylation des β -cétoesters **2**.

I.1.3 Formation des acétates d'énol **3**

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, il est nécessaire de « piéger » l'énolate du β -cétoester du type **2** avant d'effectuer la coupure oxydante. La formation d'un acétate d'énol est apparue la plus adaptée car ce composé est peu sensible à l'hydrolyse et peut être purifié par chromatographie sur gel de silice. Les composés **3a-g** ont donc été synthétisés respectivement à partir des composés **2a-g** en présence de chlorure d'acétyle dans la pyridine (Tableau 17).

entrées	R'	β -cétoester <u>2</u>	R ⁴	temps réaction (h)	rendement (%)	produit <u>3</u>
1	CH ₃	<u>2a</u>	OBn	48	64	<u>3a</u>
2	CH ₃	<u>2b</u>	(OCH ₂ CH ₂) ₃ N ₃	24	73	<u>3b</u>
3	CH ₃	<u>2c</u>		48	31	<u>3c</u>
4	CH ₃	<u>2d</u>	CO ₂ CH ₃	2	86	<u>3d</u>
5	Bn	<u>2e</u>	CO ₂ CH ₃	24	86	<u>3e</u>
6	CH ₃	<u>2f</u>	CO ₂ Bn	24	60	<u>3f</u>
7	Bn	<u>2g</u>	CH ₂ CO ₂ CH ₃	9	91	<u>3g</u>
3	tBu	<u>2h</u>	CH ₂ CO ₂ CH ₃	16	0	<u>3h</u>

Tableau 17 : temps de réaction et rendements pour les synthèses des composés 3a-g.

Les rendements après purification par chromatographie sur gel de silice sont de 60 à 86 %, mis à part pour le composé 2h qui ne réagit pas dans ces conditions. Même en chauffant par paliers de température jusqu'à 100°C sur une période de 16h, nous avons uniquement observé la décarboxylation du composé 2h. Un seul essai a été effectué pour la synthèse du composé 3c qui a été obtenu avec un rendement de 31 %. Cette réaction n'a pas été optimisée par manque de temps.

Dans tous les cas, nous n'observons qu'un seul diastéréoisomère. Les expériences de RMN que nous avons réalisées ne nous ont pas permis de déterminer la configuration du composé 3a avec certitude, mais il est vraisemblable qu'il s'agisse de l'isomère E, produit thermodynamiquement le plus stable de la réaction.

Pour les composés 3e et 3f, la purification par chromatographie sur gel de silice n'a pas permis de séparer les régio-isomères à ce stade de la synthèse. Dans ce cas encore, nous obtenons des mélanges 90/10.

I.1.4 Clivage oxydatif : préparation des cétoesters 4

Plusieurs méthodes ont été envisagées pour la synthèse des cétoesters du type 4 à partir des acétates d'énols correspondants.

➤ Méthode générale : l'ozonolyse

L'ozonolyse s'est avérée un moyen très efficace et propre pour accéder aux α -cétoesters à partir des acétates d'énol **3**. Cette réaction consiste à faire buller un mélange d'O₃/O₂ dans le milieu réactionnel refroidi à - 78 °C jusqu'à une coloration bleu indiquant un excès d'ozone en solution. Lors de l'oxydation, il se forme plusieurs intermédiaires réactionnels appelés ozonides qui peuvent être parfois très stables (plus particulièrement les ozonides secondaires). La réduction de ces intermédiaires se fait en général par ajout de diméthylsulfure ou de triphénylphosphine afin de former le produit oxydé souhaité. Dans notre cas, la formation du cétoester s'accompagne de la production d'anhydride acétique (Schéma 81).

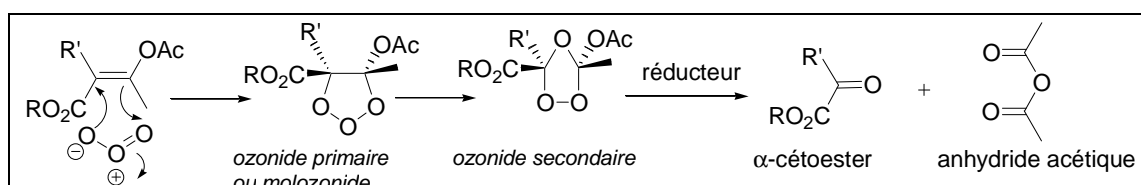


Schéma 81 : mécanisme de la réaction d'ozonolyse.

Nous avons effectué l'ozonolyse des composés **3a-b** et **3d-g** suivant le schéma décrit ci-dessous et les rendements obtenus pour chacun de ces composés sont présentés dans le tableau suivant.

entrées	R'	composés 3	R ⁴	rendement (%)	produits 4
1	CH ₃	3a	OBn	17	4a
2	CH ₃	3b	(OCH ₂ CH ₂) ₃ N ₃	83	4b
3	CH ₃	3d	CO ₂ CH ₃	72	4d
4	Bn	3e	CO ₂ CH ₃	73	4e
5	CH ₃	3f	CO ₂ Bn	98	4f
6	Bn	3g	CH ₂ CO ₂ CH ₃	59	4g

Tableau 18 : rendement obtenu pour l'ozonolyse des composés **3**.

L'ozonolyse des acétates d'énol **3a-g** se fait avec de très bons rendements à l'exception du composé **3a** (entrée 1). Dans ce cas, nous avons obtenu un faible rendement de 17 % en raison d'une oxydation secondaire du groupement benzyle en benzoate (Schéma 82).

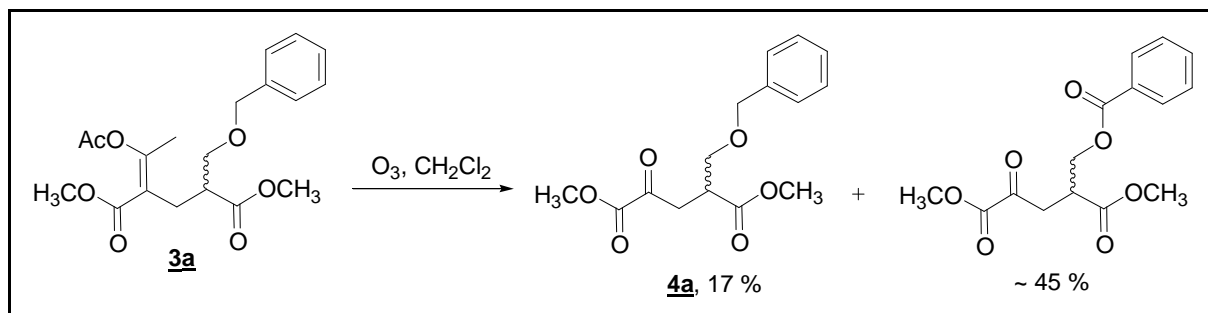


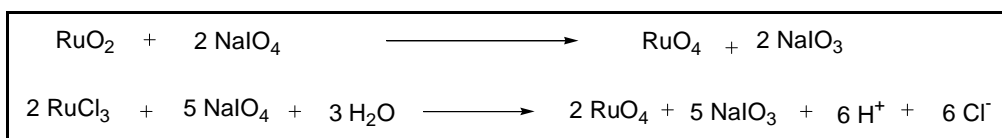
Schéma 82 : oxydation secondaire du groupement benzylique en benzoate.

Cette oxydation indésirable du groupement benzylique semble se faire simultanément avec la coupure oxydante de l'acétate d'énol et n'a pas pu être évitée.

De plus, contrairement au composé **4f** obtenu encore en mélange, le cétoester **4e** a enfin été séparé de son régio-isomère par chromatographie sur gel de silice et a pu être isolé avec un rendement de 73 %.

➤ Utilisation de RuO₄

Nous avons essayé une autre méthode d'oxydation en présence d'une quantité catalytique d'oxyde de Ruthénium dans un milieu diphasique. Le ruthénium peut être utilisé sous la forme RuCl₃ ou RuO₂ en présence de périodate de sodium (NaIO₄) générant l'espèce oxydante RuO₄ (Schéma 83).

Schéma 83 : formation de RuO₄ à partir de RuO₂ ou de RuCl₃ avec NaIO₄.

Lors de sa thèse, S. Alaux, a démontré que l'utilisation de RuO₂ était la plus adaptée à l'oxydation des 2-alkylidènes glutarate. En effet, dans le cas de RuCl₃, la libération d'ions H⁺ au cours de la réaction conduit à la formation de nombreux sous-produits via la catalyse acide de réactions secondaires.

L'oxydation du composé **3a** en présence de RuO₂ et de NaIO₄, dans un mélange CH₃CN/CHCl₃/H₂O, a conduit au cétoacide **4a** avec un rendement de 43 %. Ce rendement est malheureusement limité par l'hydrolyse de l'acétate d'énol **3a** causé par la présence d'eau dans le milieu qui est par ailleurs indispensable à la réaction. Plusieurs essais ont été effectués dans divers mélanges de solvants en minimisant la quantité d'eau mais en vain... Nous observons dans tous les cas l'hydrolyse du composé **3a**.

Un premier test d'oxydation a été effectué avec l'acétate d'énol **3c**. La réaction s'arrête rapidement, causé probablement par l'empoisonnement du catalyseur RuO_2 (Schéma 84). Dans ce cas, le cétoester **4c** n'a été isolé qu'avec un faible rendement de 10 %.

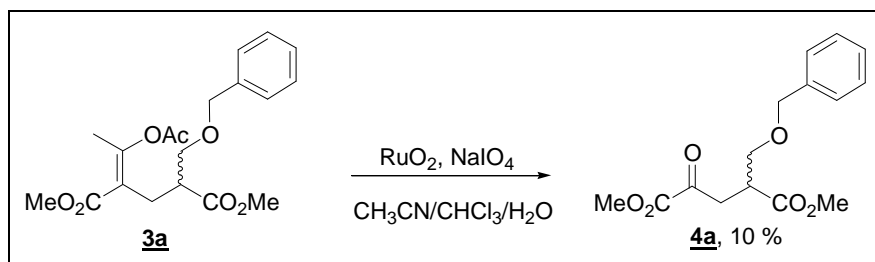


Schéma 84 : synthèse du composé **4c**.

I.1.5 Synthèse du cétoester **4i**

La déprotection de la fonction alcool permet d'accéder à l'analogue du KG **4i** comportant le groupement hydroxyméthyle en position 4. Cette déprotection se fait aisément dans le MeOH, en présence d'une quantité catalytique de Palladium sur charbon à 10 %. Le composé **4i** a été isolé avec un rendement de 96 % (Schéma 85).

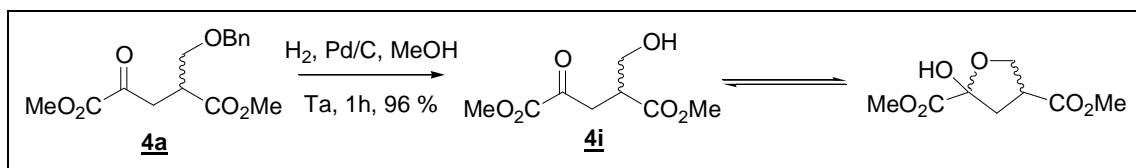


Schéma 85 : synthèse du cétoester **4i**.

Cependant, d'après la RMN, nous avons constaté que le composé **4i** cyclise en solution en formant un mélange équimolaire de diastéréoisomères en équilibre.

I.1.6 Déprotection sélective du cétoester **4f**

L'hydrogénation du composé **4f** en présence de palladium sur charbon à 10 % a permis d'obtenir le monoacide correspondant **4j** isolé après purification par chromatographie avec un rendement de 70 % (Schéma 86). Cette chromatographie nous a enfin permis de séparer composé **4j** de son régio-isomère, ce qui n'avait pas été possible lors des étapes précédentes.

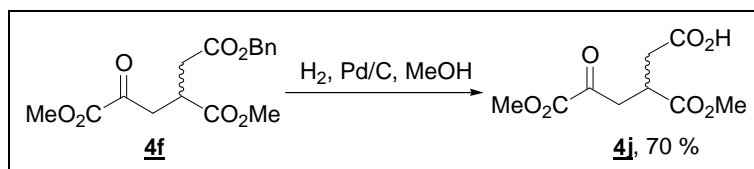


Schéma 86 : synthèse du composé **4j**.

I.1.7 Synthèse d'amides à partir du composé **4j**

Nous avons tout d'abord essayé différentes méthodes de couplage entre le composé **4j** et la propylamine. Ces méthodes ont donné, pour la plupart, des rendements modestes

(Tableau 19). L'utilisation de la base NMM (N-Méthyl-Morpholine) et de l'agent de couplage IBCF (iso-butyl-chloroformate) dans l'Et₂O s'est avérée être la plus adaptée pour le couplage de ces composés (entrée 4).


								
entrées	amine	base	Agent de couplage	solvants	T (°C)	Temps de réaction (h)	Rendement (%)	Produit final
1	propylamine	Et ₃ N	BOP	CH ₃ CN	Ta	14	51	4k
2	propylamine	Et ₃ N	BOP	Et ₂ O	Ta	18	22	4k
3	propylamine	NMM	IBCF	Et ₂ O	Ta	14	57	4k
4	diéthylamine	NMM	IBCF	Et ₂ O	Ta	14	70	4l

Tableau 19 : essais de couplage entre le composé **4j** et deux amines.

Après purification par chromatographie sur gel de silice du résidu **4k**, deux produits majoritaires ont été isolés séparément : l'un est sous la forme d'un solide blanc et l'autre d'une huile incolore. D'après les données analytiques, ces composés sont des isomères. Dans les deux cas, le spectre RMN ¹³C ne présente aucun signal correspondant à la fonction cétone (vers 190-200 ppm) caractéristique des cétoesters. Par contre, tous deux présentent un signal correspondant à un carbone quaternaire vers 100 ppm, caractéristique des carbones du type acétalique. Il est donc apparu que le cétoester **4k** cyclise spontanément en solution formant ainsi deux diastéréoisomères très stables. Cette cyclisation est le résultat de l'attaque de l'azote amidique sur la cétone formant ainsi deux 6-hydroxy-2-pypéridines, isomères du composé **4k** (Schéma 87). La forme acyclique du composé **4k** en solution n'est pas détectable par RMN.

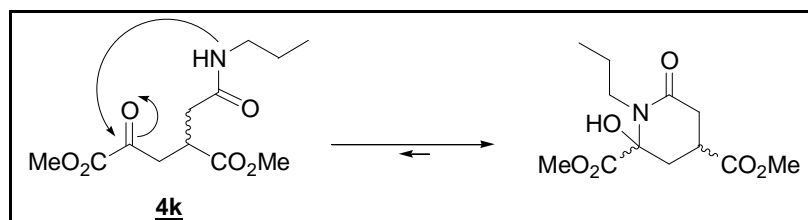


Schéma 87 : cyclisation du cétoester **4k** en solution.

Pour confirmer notre hypothèse, nous avons essayé de montrer l'existence d'un équilibre entre les 2 isomères cycliques. Nous avons chauffé l'un des deux diastéréoisomères

en solution dans le MeOH deutéré pendant 3h à 55 °C. Nous avons ainsi vu apparaître en RMN ^1H , un mélange quasi-équimolaire (4/6) des deux diastéréoisomères.

Ce type de cyclisation a déjà été décrit. Ainsi, plusieurs travaux portant sur la transamination de la glutamine^{174,175} et de ses analogues¹⁷⁶ relatent la cyclisation favorable de l' α -cétoacide formé à partir de la glutamine (Schéma 88). Ces dérivés cycliques, dépourvus de fonction cétone, ne sont pas substrats des transaminases.

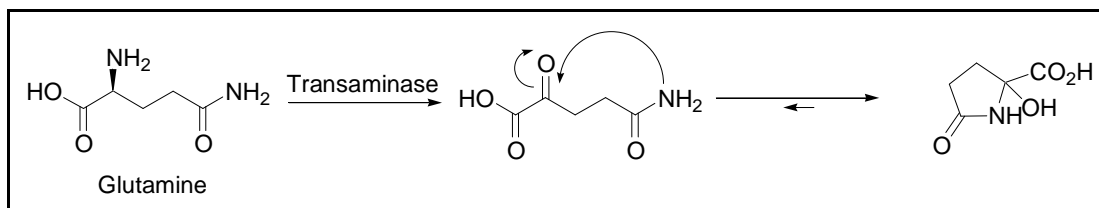


Schéma 88 : cyclisation spontanée de l'acides céto-glutaramique et de ses analogues.

Par la suite, afin de confirmer encore cette hypothèse et d'éviter cette cyclisation, un second couplage a été effectué avec une amine secondaire, la diéthylamine, en présence de NMM et d'IBCF dans Et₂O (entrée 4, Tableau 19). Le produit **4l** a été isolé sous sa forme non cyclique avec un rendement de 70 %.

I.1.8 Hydrolyse des cétoesters : préparation des cétoacides

La réaction d'hydrolyse des esters méthyliques est effectuée dans des conditions très douces. Les cétoesters **4a-b**, **4d**, **4i**, **4k** et **4l** ont été saponifiés par une quantité stœchiométrique de LiOH 0,2 M dans un mélange MeOH/H₂O (

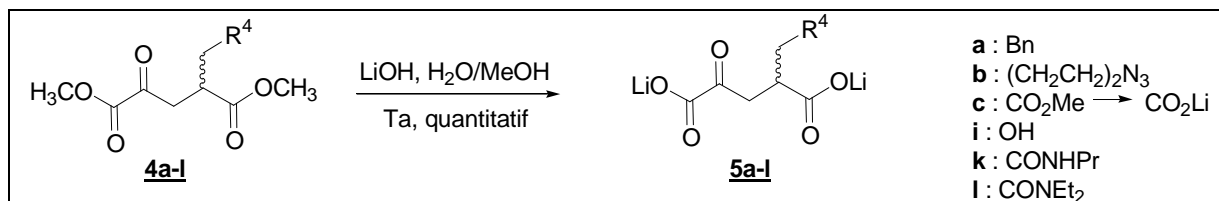
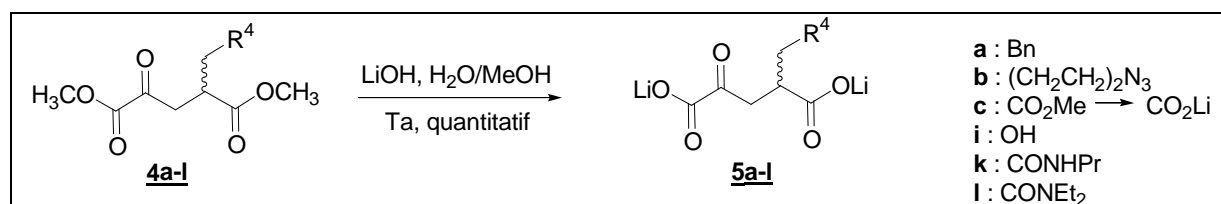


Schéma 89). Dans ces conditions, la réaction est quantitative au bout de 10 à 15h à température ambiante. Le très léger excès de LiOH est neutralisé en ajoutant une résine acide (Dowex H⁺) jusqu'à obtention d'un pH compris entre 7,0 et 7,6. L'eau est ensuite évaporée et les cétoesters sont isolés sous la forme de sels d'ammonium.

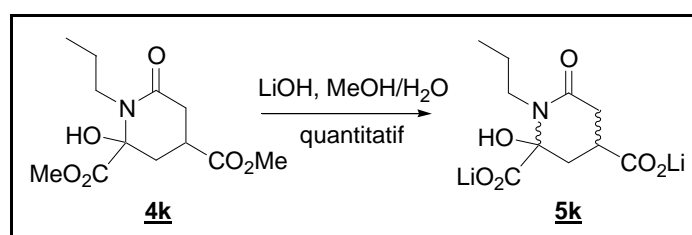
¹⁷⁴ T. T. Otan, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, **1957**, 224, 137-148.

¹⁷⁵ L. B. Hersh, *Biochemistry*, **1971**, 10, 2884-2891.

¹⁷⁶ A. J. L. Cooper, A. Meister, *J. Biol. Chem.*, **1973**, 24, 8499-8505.

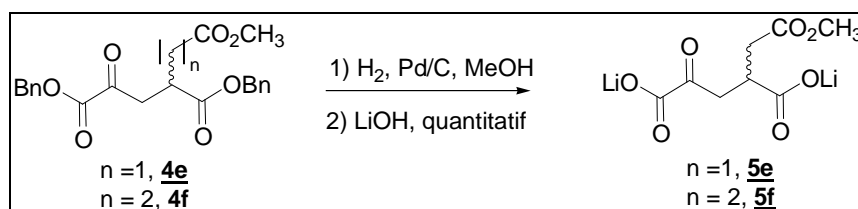
Schéma 89 : hydrolyse des cétoesters méthyliques **5a-b**, **5d** et **5k-l**.

L'hydrolyse des esters d'un des isomères cycliques du composé **4k**, conduit à un mélange des diastéréoisomères des cétoacides cycliques correspondants (Schéma 90). Ce résultat n'est pas surprenant compte tenu de la possibilité de catalyse basique pour l'interconversion des différentes formes déjà démontrée dans le cas de l'acide céto glutaminique formé à partir de la glutamine¹⁷⁵.

Schéma 90 : hydrolyse du composé **4k**.

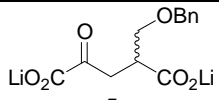
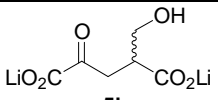
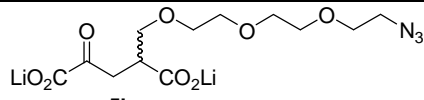
Il faut souligner que dans le cas de l'hydrolyse des composés **4k** et **4l**, les fonctions amides n'ont pas été altérées et le rendement reste quantitatif.

Les esters benzyliques des composés **4e** et **4g** ont été clivés par hydrogénation catalytique en présence de Palladium sur charbon (Schéma 91). Cette méthode est quantitative et permet de conserver les esters méthyliques. Après filtration du catalyseur, le pH du milieu est ajusté à 7,6 par ajout d'une quantité stoechiométrique de LiOH afin d'obtenir les cétoacides sous forme de sels de lithium.

Schéma 91 : hydrolyse des cétoesters **4e** et **4f**.

I.1.9 Conclusion

Le tableau suivant résume les différents composés du type **5** synthétisés à partir des acrylates correspondants suivant la méthode basée sur la condensation de Michael.

Composés 5			
Rendement global	26 %	25 %	38 %

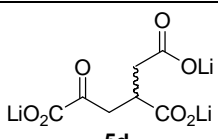
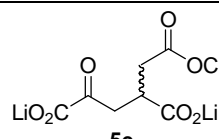
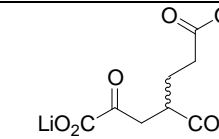
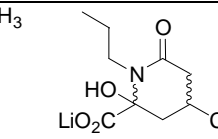
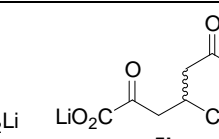
				
5d	5e	5g	5k	5l
48 %	43 %	40 %	19 %	23 %

Tableau 20 : rendements globaux pour la synthèse d'analogues du KG en utilisant la méthode basée sur la condensation de Michael.

Nous avons montré que cette méthode développée initialement pour les dérivés du KG alkylés en position 3 est généralisable aux dérivés substitués en 4 et permet l'introduction de groupements fonctionnalisés sur le squelette du KG. Le rendement global pour chacun des composés **5a-l** que nous avons préparé, est compris entre 19 et 43 %, ce qui reste correct sachant que cette méthode compte au minimum 4 étapes. Le rendement du composé **5a** est le plus faible en raison de l'oxydation secondaire indésirable du groupement benzylique en position 4. La synthèse des dérivés **5k** et **5l** comporte deux étapes supplémentaires qui diminuent le rendement global à environ 20 %.

I.2 Développement d'une nouvelle méthode générale : synthèse d'analogues fonctionnalisés du KG à partir de la cyclohexanone 2,4-dicarboxylate de méthyle

I.2.1 Schéma général

Pour éviter la formation du cycle à six chaînons observée dans le cas du dérivé **5k**, nous avons développé une nouvelle stratégie de synthèse en préparant des analogues amidiques présentant une chaîne plus longue en position 4. Cette nouvelle voie de synthèse est décrite dans le schéma ci-dessous.

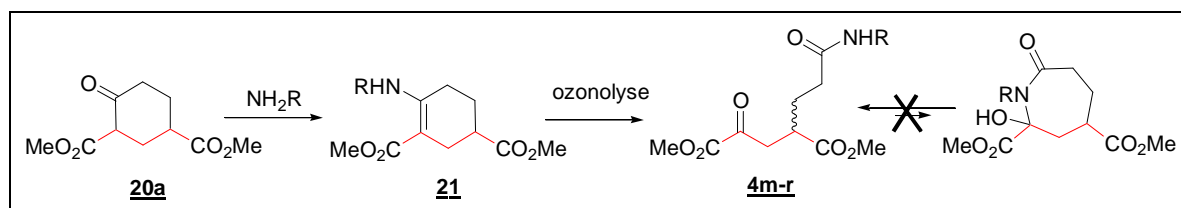


Schéma 92 : synthèse d'analogues du KG à partir de la cyclohexanone 2,4-dicarboxylate de méthyle.

Cette méthode est basée sur la coupure oxydante d'une énamine cyclique **21** facilement obtenue à partir de la cyclohexanone **20a** dont plusieurs synthèses sont décrites dans la littérature.

I.2.2 Synthèse de la cyclohexanone **20a**

Nous avons reproduit une synthèse décrite dans la littérature comportant 4 étapes sans purification intermédiaire¹⁷⁷ : la double condensation de Michael d'une molécule de malonate d'éthyle (ou de méthyle) sur deux molécules d'acrylate d'éthyle (ou de méthyle) a permis d'obtenir le composé **17**. Ce dernier a été hydrolysé et décarboxylé en présence d'une solution aqueuse d'HCl 6N à reflux. Une estérification a conduit alors au triester **19a**, qui après cyclisation intramoléculaire de Dieckmann, a permis de former la cyclohexanone **20a** avec un rendement global de 60 % (Schéma 93). Notons que le composé **20a** est exclusivement sous sa forme énol en solution dans le chloroforme.

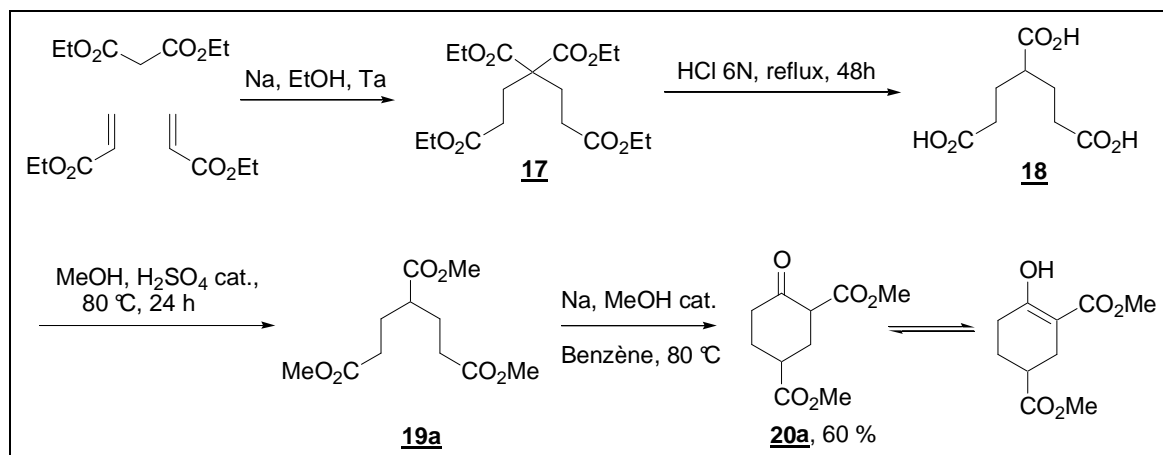


Schéma 93 : synthèse de la cyclohexanone **20a**.

Pour des raisons de sécurité, nous avons essayé la réaction de Dieckmann dans le toluène qui est moins toxique que le benzène. Malgré les propriétés physico-chimiques très proches de ces deux solvants, cette réaction dans le toluène n'a donné qu'un rendement de 35 % alors que dans le benzène, nous avons obtenu un rendement de 75 % à partir d'un échantillon purifié de **19a**.

Cette synthèse peut également s'effectuer à partir de l'acrylonitrile¹⁷⁸ à la place de l'acrylate d'éthyle ou de méthyle. Les nitriles sont aussi hydrolysés dans HCl 6N à reflux conduisant au même triacide **18**.

¹⁷⁷ P. N. Chakraborty, R. Dasgupta, S. K. Dasgupta, S. R. Ghosh, U. R. Ghatak, *Tetrahedron*, **1972**, 28, 4653-4665.

¹⁷⁸ R. Koehler, L. Goodman, J. Degraw, B. R. Baker, *J. Org. Chem.*, **1958**, 80, 5779-5786.

Une autre méthode «one pot» a été décrite plus récemment pour la préparation du composé **20a**¹⁷⁹ isolé avec un rendement de 40 %. Cette réaction fait intervenir 2 éq. de NaOMe et 1 éq. d'acrylate de méthyle (1 éq.) avec 2 équivalents d'AcOEt (Schéma 94). Plusieurs essais ont été effectués en respectant les données de la littérature sans obtenir le produit souhaité.

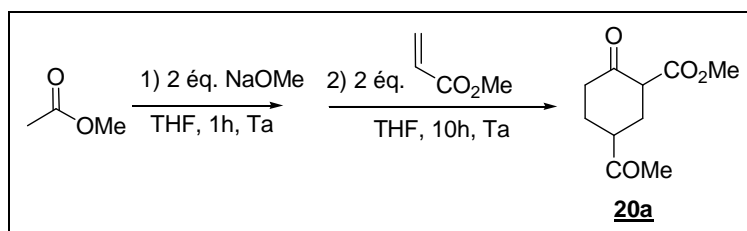


Schéma 94 : synthèse « one pot » du composé **20a** décrite dans la littérature.

En supposant que la première étape de cette réaction est l'auto-condensation de l'AcOMe formant l'acétoacétate de méthyle, nous avons conduit plusieurs essais à partir de ce composé (Schéma 95).

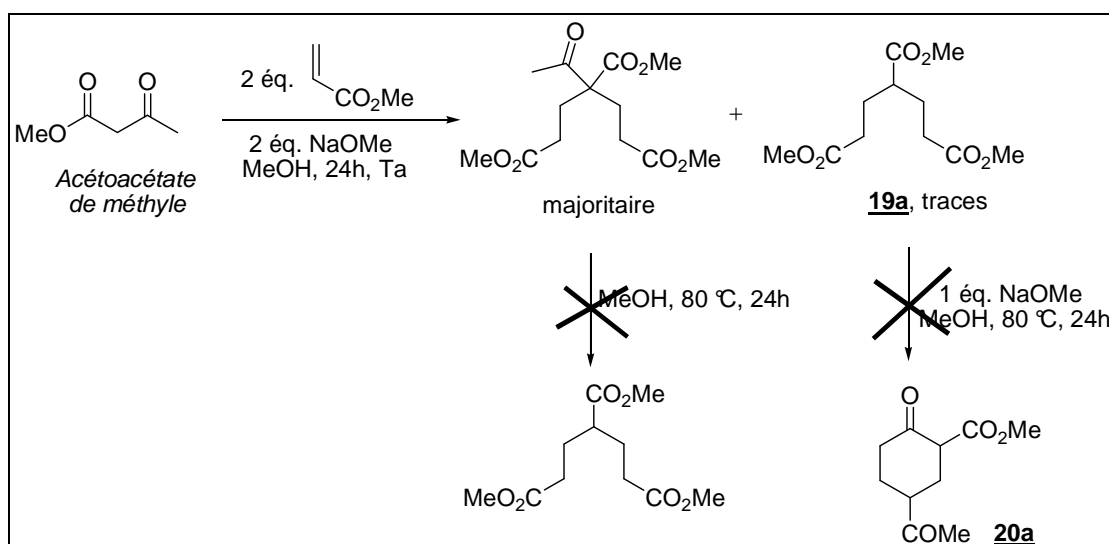


Schéma 95 : tentative de synthèse du composé **20a** à partir de l'acétoacétate de méthyle.

La réaction d'1 éq. d'acétoacétate de méthyle avec 2 éq. d'acrylate de méthyle en présence de 2 éq. de NaOMe dans le MeOH conduit au produit de la double addition de Michael. La dé-acétylation de ce composé, à priori favorable par réaction de rétro-claisen, semble difficile, même en chauffant à 80 °C. De plus, la cyclisation intramoléculaire du triester **19a**, en présence d'1 éq. de NaOMe dans le MeOH à 80 °C, ne semble pas se produire dans ces conditions. Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi de ne pas poursuivre cette étude.

¹⁷⁹ M. Periasamy, M. R. Reddy, U. Radhakrishnam, A. Devasagayaraj, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 4997-4999.

Une autre méthode publiée en 1989¹⁸⁰, utilise le LDA comme base à la place du NaOMe. L'analogue éthylique du composé **20a**, a été synthétisé en une seule étape à partir de l'acétate d'éthyle et l'acrylate d'éthyle avec un rendement de 49 % (Schéma 96). Par manque de temps, nous n'avons malheureusement pas pu reproduire cette réaction au laboratoire.

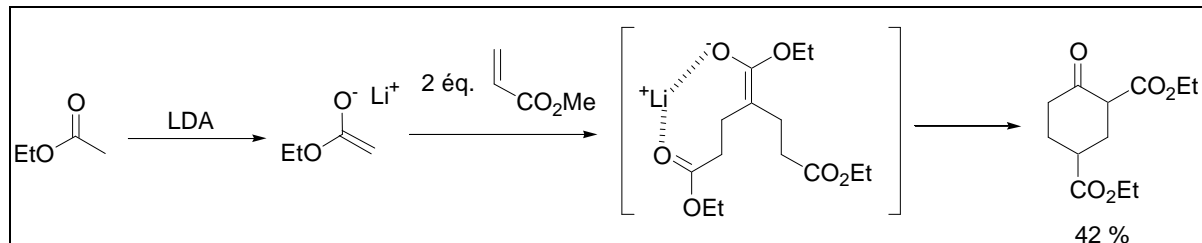


Schéma 96 : synthèse « one pot » de la cyclohexanone 2,4 dicarboxylate de méthyle décrite dans la littérature¹⁸⁰

I.2.3 Préparation des énamines **21**

La réaction d'un β -cétoester avec divers amines primaires en présence de tamis moléculaire permet de former les β -énaminoester correspondants avec de très bons rendements¹⁸¹ (Schéma 97).

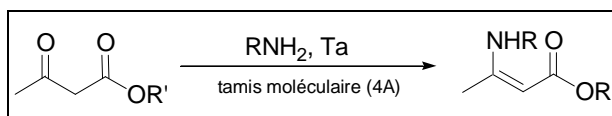


Schéma 97 : synthèse d'énaminones à partir de β -cétoesters.

Nous avons choisi d'adopter cette méthode pour préparer les composés **21** (Schéma 98). Ainsi, des mélanges du composé **20a** et d'une amine RNH_2 en solution dans le toluène sont agités à Ta pendant 48h, en présence de tamis moléculaire pour former les énamines **21n-r**. Les énamines n'ont pas été purifiées par chromatographie sur gel de silice afin d'éviter leur hydrolyse.

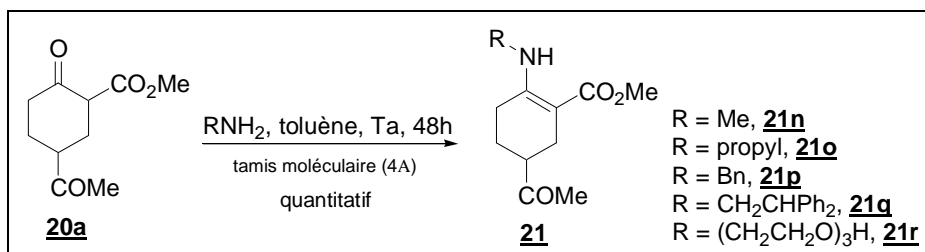


Schéma 98 : préparation des énamines **21n-r**.

Le temps de réaction pourrait être optimisé par irradiation du milieu réactionnel aux micro-ondes¹⁸². Cependant, nous n'avons pas pu effectuer de tels essais car le matériel adéquat n'était pas disponible au laboratoire lors de ma thèse.

¹⁸⁰ G. H. Posner, E. M. Shulman-Roskes, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 3514-3515.

¹⁸¹ C. Zhou, D. M. Birney, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 86-94.

Les amines utilisées pour la préparation des énamines cycliques de type **21** sont commerciales à l'exception du 2-(aminoéthoxy)-2-éthoxy]éthanol **22**, synthétisé en une étape partir de l'azoture **8** (Schéma 99).

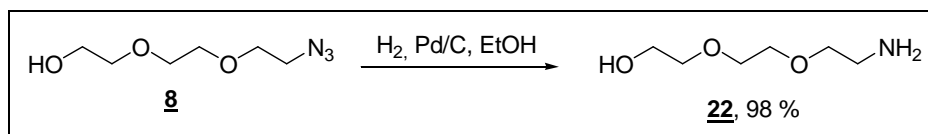


Schéma 99 : synthèse de l'amine **22**.

La synthèse du composé **21m** a été décrite en faisant buller de l'ammoniac gazeux dans une solution du composé **20a** à des températures élevées et en présence de nitrate d'ammonium¹⁸³. Cette stratégie dont la mise en œuvre est complexe, n'a pas été utilisée dans le cadre de nos travaux. Nous avons choisi de mettre au point une méthode plus simple.

L'utilisation d'une solution commerciale d'ammoniac dans le dioxane, en présence de tamis moléculaire, ne donne cependant que 12 % de conversion au bout de 8 jours de réaction. C'est en utilisant une quantité stœchiométrique d'ammoniac aqueux à 20 % dilué dans le MeOH que le composé **21m** a pu être obtenu après 48h, avec un rendement quantitatif et une bonne pureté d'après la RMN (Schéma 100).

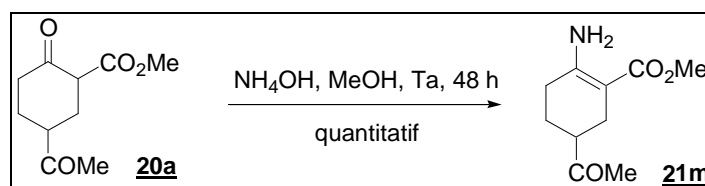


Schéma 100 : synthèse de l'énamine **21m**.

I.2.4 Oxydation : préparation des β -cétoesters

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les énamines **21**, sensibles à l'hydrolyse, ont été directement ozonolysées sans purification préalable. L'ozonolyse est effectuée dans le CH_2Cl_2 anhydre à -78°C et est suivie d'une réduction en présence de triphénylphosphine (PPh_3) (Schéma 101).

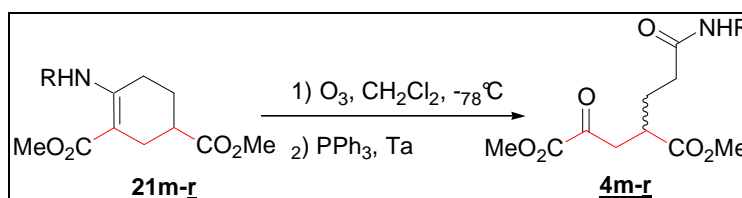


Schéma 101 : synthèse des dérivés amidiques **4**.

Le tableau ci-après présente les rendements obtenus pour chacun des composés **4m-r**.

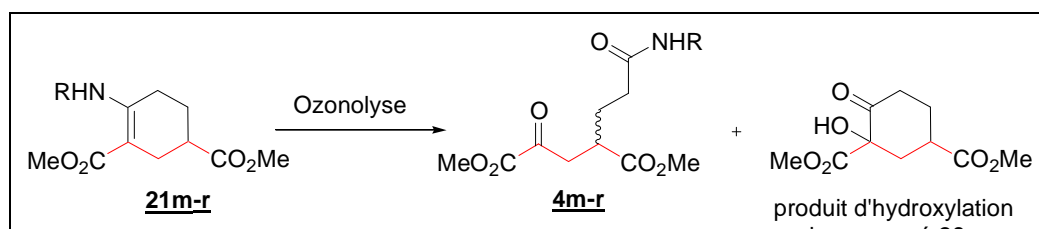
¹⁸² . M. Birney, X. Xu, S. Ham, X. Huang, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7114-7120.

¹⁸³ R. L. Augustine, R. F. Bellina, *J. Org. Chem.*, **1968**, 33, 1287-1288 et références citées.

R	H	Me	Propyl	Bn	CH ₂ CH(Ph) ₂	(CH ₂ CH ₂ O) ₃ H
Rendement (%)	41	35	35	43	25	35
Produit final	<u>4m</u>	<u>4n</u>	<u>4o</u>	<u>4p</u>	<u>4q</u>	<u>4r</u>

Tableau 21 : rendements obtenus pour la synthèse des cétoesters **4m-r**.

Comme nous l'attendions, les cétoesters **4m-r** ont été obtenus sous leur forme non cyclique. Cependant, les rendements sont décevants. Malgré toutes les précautions prises pour conserver un milieu anhydre, l'ozonolyse conduit également au produit d'hydroxylation du composé **20a** (Schéma 102).

Schéma 102 : réaction d'ozonolyse des énamines **21**.

Rappelons que cette réaction d'hydroxylation avait déjà été observée au laboratoire lors de l'ozonolyse des énolates alcalins (cf Chap IV, partie I). Nous supposons que ce produit secondaire se forme à partir des ozonides, intermédiaires de la réaction, suivant le mécanisme décrit dans le schéma ci-dessous. Ainsi, il existerait une compétition entre cette élimination d'oxygène et le réarrangement des molozonides.

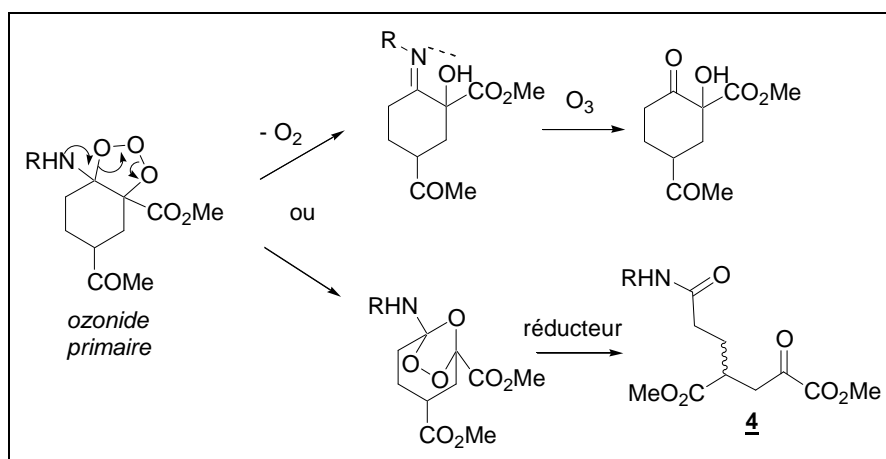


Schéma 103 : compétition entre l'élimination d'oxygène et le réarrangement des molozonides.

Plusieurs conditions de réduction ont par ailleurs été essayées dans le cas du produit **4p** (R = Bn) afin de favoriser sa formation par rapport au produit d'hydrolyse (Tableau 22).

réducteurs	Temps entre la fin de l'ozonolyse et l'ajout du réducteur (h)		Rendement (%)
Me ₂ S	0		45
Me ₂ S	14		42
PPh ₃	14		43

Tableau 22 : rendement obtenu pour le composé **4p** en variant le type de réducteur et le moment de son ajout dans le milieu réactionnel

L'emploi du Me₂S à la place du PPh₃ n'améliore pas le rendement de la réaction d'ozonolyse, même si nous laissons le milieu réactionnel, après l'ozonolyse, agité à Ta pendant une nuit (14h) avant l'ajout du réducteur. Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse formulée précédemment qui implique une compétition entre la formation de l'ozonide secondaire (à partir du molozonide) et l'élimination d'O₂.

I.2.5 Déprotection du composé **4p**

Nous n'avons pas pu préparer le cétoester **4m** (R=H) par hydrogénation catalytique de son analogue benzylé **4p** (R=Bn) en présence de Pd/C (Schéma 104). En effet, il s'avère que la déprotection d'un amide benzylique reste très difficile et nécessite l'utilisation de forts réducteurs tels que Na/NH₃ ou Li/naphtalène¹⁸⁴.

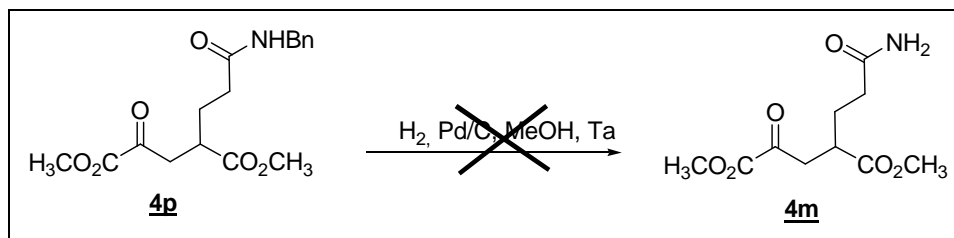


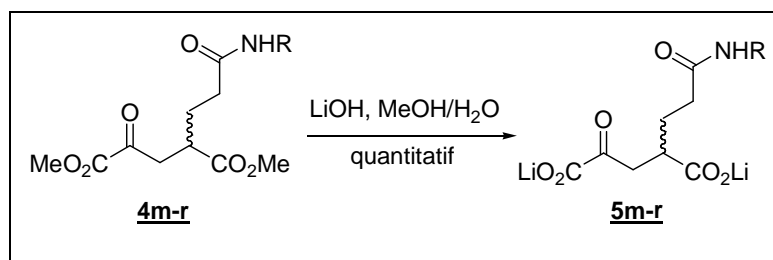
Schéma 104 : essais de déprotection de l'amide benzylique du composé **4p**.

Nous n'avons pas poursuivi cette étude car comme nous l'avons vu, le composé **4m** a pu être préparé à partir du précurseur **21m**.

I.2.6 Hydrolyse des cétoesters **4m-r**

Comme dans le cas des composés **4a-l**, l'hydrolyse des cétoesters **4m-r** a été réalisée en présence d'une quantité stœchiométrique de LiOH (Schéma 105). Cette hydrolyse est quantitative et sélective de la fonction ester.

¹⁸⁴ C-Y Chern, Y-P Huang, W. M. Kan, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 1039-1041 et les références citées

Schéma 105 : hydrolyse des cetoesters **4m-r**.

I.2.7 Préparation d'éthers d'énols

Nous avons envisagé d'utiliser cette approche pour introduire la fonction ester sur les substituants en position 4 des analogues du KG. Le Schéma 106 présente la synthèse envisagée.

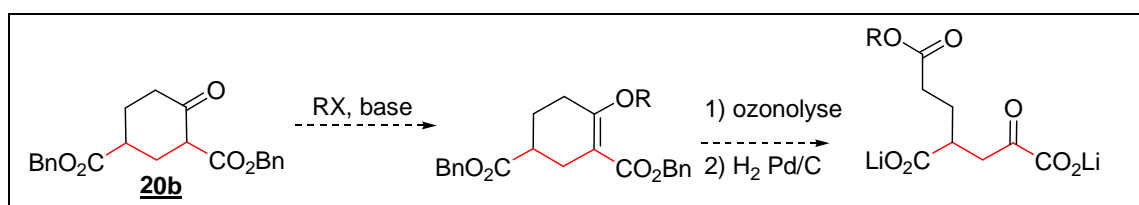
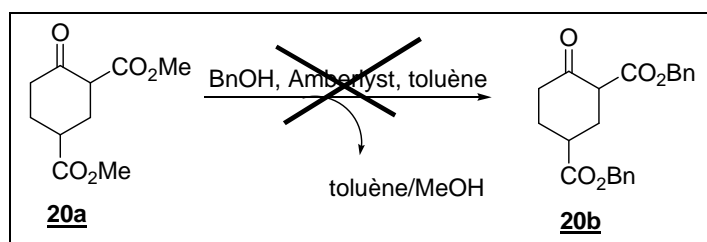


Schéma 106: nouvelle stratégie pour la synthèse d'analogues du KG fonctionnalisés.

La O-alkylation de la cyclohexanone **20b** présentant 2 esters benzyliques, pourrait ainsi permettre de former un éther d'énol qui, à la suite d'une ozonolyse et d'une hydrogénolyse sélective des esters benzyliques, donnerait un cétoacide fonctionnalisé en position 4 par divers esters.

A. Synthèse de la cyclohexanone **20b**

Nous avons tout d'abord envisager la transestérification du composé **20a**. Nous avons effectué un premier essai avec BnOH en présence d'Amberlyst 15 (H^+) dans le toluène en distillant l'azéotrope toluène/MeOH pour déplacer l'équilibre de la réaction (Schéma 107). Cependant, les conditions acides favorisent à la fois la transestérification et la formation de l'éther d'énol. Nous avons donc obtenu un mélange des produits de ces deux réactions.

Schéma 107 : tentatives de transestérification du composé **20a**.

Des exemples de transestérification en milieu basique (DMAP) de β -cétoesters ont été publiés¹⁸⁵. Le déplacement d'équilibre est assuré en travaillant soit dans le toluène pour distiller l'azéotrope formé avec le MeOH, soit en présence de tamis moléculaire pour piéger le MeOH produit. Nous avons testé ces 2 approches mais, dans les deux cas, seul l'un des deux esters méthyliques a été transestérifié. Nous supposons, par homologie avec les travaux décrits dans la littérature, qu'il s'agit de l'ester en β de la cétone, bien que l'on puisse s'attendre à ce que cet ester soit le moins réactif en raison de la formation de l'énolate délocalisé en milieu basique. A ce stade, nous n'avons pas poursuivi cette étude bien qu'il existe d'autres méthodes de transestérification. Nous avons préféré adapter la synthèse du composé **20a** à celle de son analogue **20b** (Schéma 108).

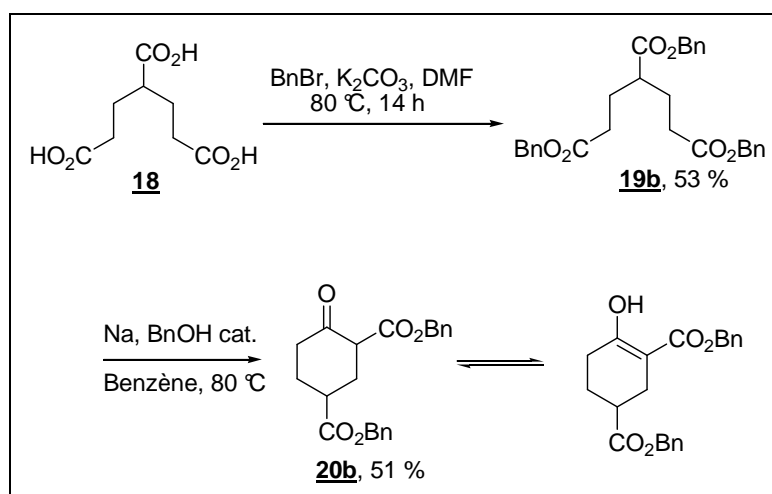


Schéma 108 : synthèse de la cyclohexanone **20b**.

Le triacide **18** a donc été benzylé en présence de BnBr et de K_2CO_3 . Le triester correspondant **19b** a subi la cyclisation de Dieckmann en présence de Na et d'une quantité catalytique de BnOH. Le composé **20b** a ainsi été obtenu en 4 étapes avec un rendement global de 27 %, ce qui est très inférieur à celui obtenu pour le composé **20a**. Tout comme son analogue, la cyclohexanone **20b** se présente uniquement sous sa forme énol en solution dans le $CDCl_3$.

B. Synthèse des éthers d'énols cycliques

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'ajout d'alcool à un β -cétoester en milieu acide entraîne une compétition entre la formation d'éther d'énol et la transestérification du produit. L'utilisation d'un réactif du type RX où X est un groupement partant comme Cl ou OTs, d'un solvant polaire aprotique tel que le DMSO ou l'HMPA et d'un contre-ion moins dur que Li^+

¹⁸⁵ J. C. Gilbert, T. A. Kelly, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 449-450.

pour l'énolate (comme K^+ ou Na^+), sont les conditions les plus favorables à la O-alkylation par rapport à la C-alkylation. Nous avons effectué trois essais de O-alkylation en utilisant un électrophile chloré présentant une chaîne polyéther. Trois bases différentes ont été essayées mais sans succès (Schéma 109).

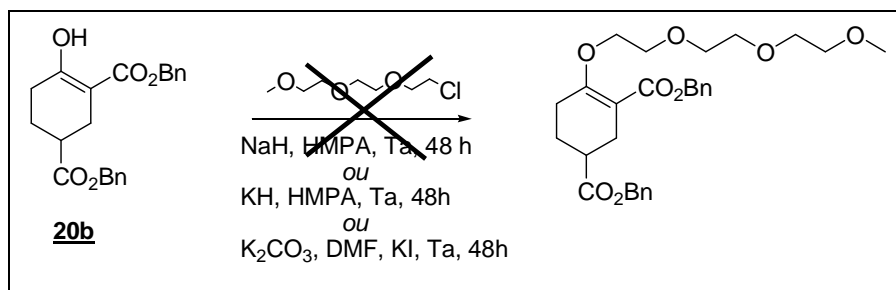


Schéma 109 : tentatives de formation d'éthers d'énol à partir du composé **20b**.

Il semble que le composé **20b** ne soit pas réactif dans ces conditions. Il se pourrait également que la présence des oxygènes au niveau de l'électrophile perturbe la réaction.

I.2.8 Conclusion et perspectives

Cette méthode, basée sur la coupure oxydante d'une énamine cyclique, a permis de synthétiser une variété de dérivés du KG fonctionnalisés par diverses amides en position 4. Le tableau suivant présente les rendements globaux pour chacun de ces composés obtenus à partir de la cyclohexanone **20a**.

Composés 5			
5m	5n	5o	
Rendement global	38 %	33 %	35 %

5p	5q	5r
43 %	21 %	34 %

Tableau 23 : rendements globaux obtenus pour la synthèse des dérivés amidiques **5m-r**.

Les rendements sont du même ordre que ceux obtenus avec la méthode de Michael bien qu'il n'y ait que deux étapes. L'ozonolyse des énaminoesters n'est pas favorable à la formation des cétoesters et reste l'étape limitante de cette méthode. D'autres essais d'optimisation des conditions d'ozonolyse pourraient permettre d'améliorer cette étape.

En dépit de l'échec rencontré avec les éthers d'énol susceptibles de donner accès à des analogues du KG portant un groupement ester, il semble très intéressant de continuer à développer cette approche synthétique. En effet, la synthèse d'un carbonate d'énol à partir de la cyclohexanone **20b** pourrait être une alternative : l'ozonolyse conduirait à un anhydride mixte carbonique, susceptible de réagir, de façon régiosélective, avec divers nucléophiles dont des alcools ou des amines (Schéma 110).

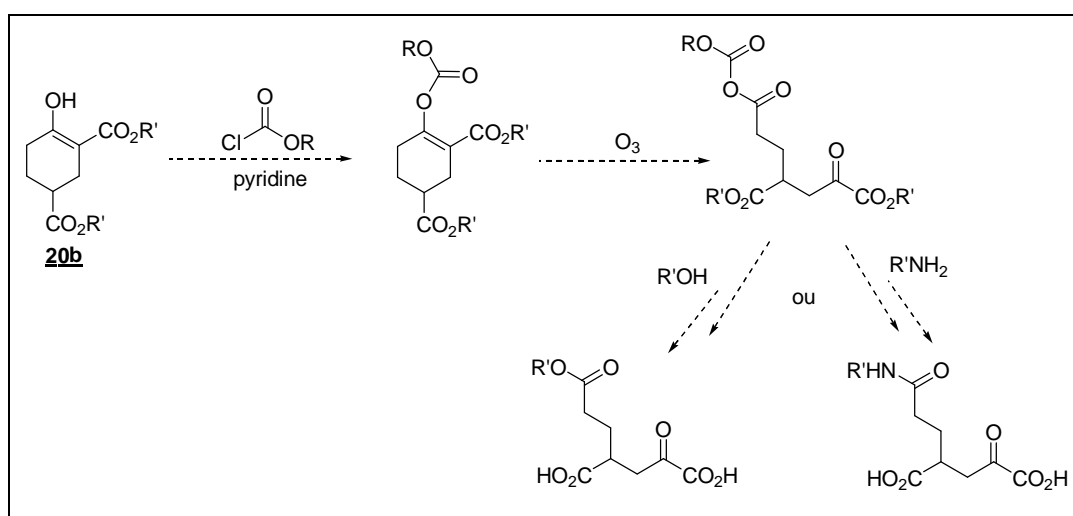


Schéma 110 : perspective pour former des analogues du KG fonctionnalisés.

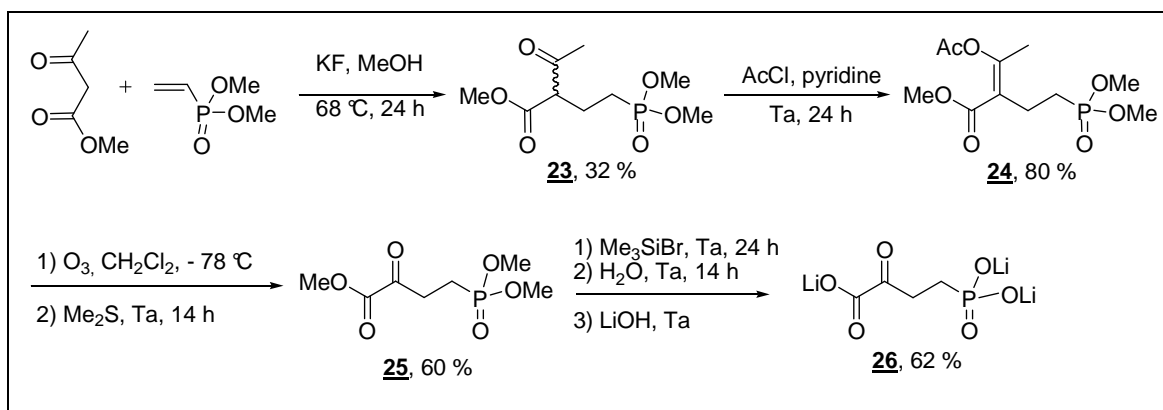
En conclusion de cette partie relative aux analogues du KG substitués en position 4, les cétoacides **5a-r** ont été obtenus sous forme racémique. L'étude de leur qualité de substrat et leur dédoublement cinétique par transamination enzymatique sont décrites dans la suite de ce mémoire.

1.3 Préparation d'analogues phosphoniques du KG

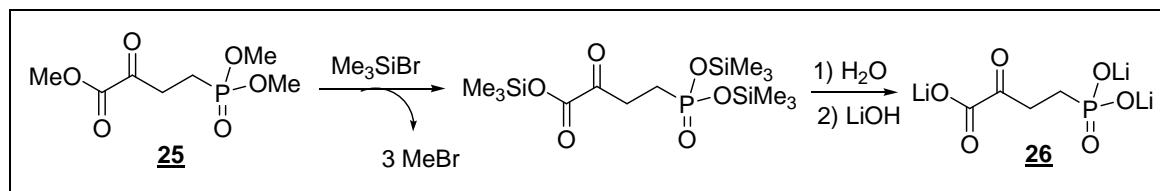
Ces analogues constituent des précurseurs potentiels d'analogues du Glu tels que l'AP4, un agoniste sélectif des mGluRs du groupe III. Ainsi, un groupement phosphonate peut mimer le carboxylate en γ du KG et établit des interactions de même nature avec le site actif des transaminases.

➤ Synthèse du précurseur de l'AP4

Le diméthylvinylphosphonoacétate est commercial, la méthode basée sur la condensation de Michael a été utilisée pour la préparation du composé **26** (Schéma 111).

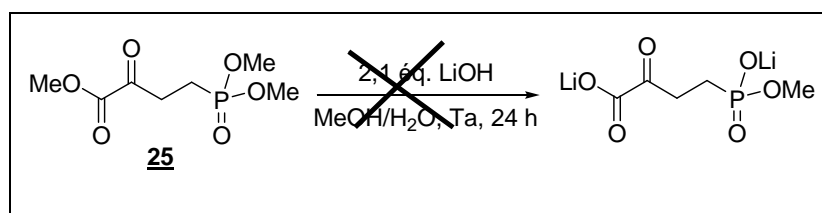
Schéma 111 : synthèse du composé **26**.

La condensation de Michael entre l'acétoacétate de méthyle et le vinylphosphonoacétate de diméthyle a conduit au β -cétoester **23** avec un rendement de 32 %. Le vinylphosphonoacétate se polymérise en partie dans le milieu réactionnel, ce qui explique le faible rendement de cette réaction. La formation de l'acétate d'énol **24**, suivie de l'ozonolyse permettent de former le cétoester **25** avec des rendements corrects. La déprotection simultanée des acides carboxylique et phosphonique a été effectuée sous l'action du bromotriméthylsilane (Me_3SiBr), suivie d'une hydrolyse¹⁸⁶ des esters silylés formés (Schéma 112). Le pH du milieu a finalement été ajusté à 7,6 par addition d'une solution aqueuse de LiOH pour obtenir le composé **26** sous la forme d'un sel de lithium isolé avec un rendement de 62 %.

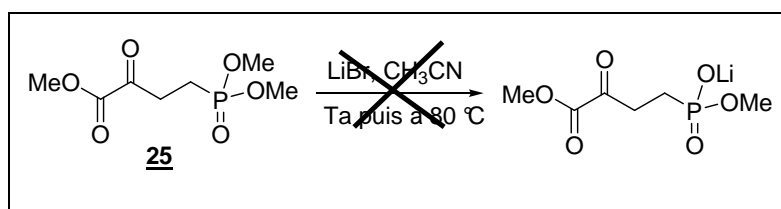
Schéma 112 : déprotection du composé **26**.

Afin de mimer au mieux le groupement carboxylate en α du KG, nous avons effectué plusieurs essais de déprotection partielle pour obtenir un phosphonate monométhylé. L'utilisation de TMSBr ou TMSI ne permet pas d'effectuer cette mono-déprotection. Un essai a été réalisé en présence de 2,1 éq. de LiOH (schéma 113). Nous observons bien la disparition du composé de départ mais celle-ci s'accompagne de la formation d'un mélange de produits difficiles à analyser.

¹⁸⁶ J. Zygmunt, P. Kafarski, P. Mastalerz, *Synthesis*, **1978**, 609-612.

Schéma 113 : tentative de mono-déprotection du composé **25**.

T. Wang et al. ont publié un article sur l'utilisation de LiCl ou LiBr pour la monodealkylation de diméthyl-phosphonates¹⁸⁷. Dans notre cas, nous n'avons observé aucune réaction entre le composé **25** et LiBr dans CH₃CN, après 24h d'agitation à Ta. Lorsque le milieu réactionnel est chauffé à 80 °C, le produit de départ se dégrade pour conduire à un mélange complexe (schéma).

Schéma 114 : tentative de monodéprotection du composé **25**.

Par manque de temps, nous n'avons pas poursuivi cette étude. D'autres expériences restent encore à faire, notamment en étudiant l'influence du solvant et du chauffage. De plus, il aurait fallu tester d'autres réactifs tels que NaI¹⁸⁸, LiCl¹⁸⁹ et LiI²⁶ dans l'espoir d'atteindre notre objectif.

I.4 Préparation d'un analogue hétérocycliques du KG

Comme nous l'avons vu (cf Chap IV, partie I), la méthode de Wasserman s'est avérée efficace dans le cadre de la synthèse d'analogues cyclobutaniques du KG, précurseurs des L-CBG I-IV¹⁵. Nous avons envisagé la même approche dans le but de préparer un analogue hétérocyclique comportant un cycle β -lactame en position 3 et 4. La synthèse envisagée est décrite dans le schéma suivant :

¹⁸⁷ T. Wang, H. W. He, *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.*, **2004**, 179, 2081-2089.

¹⁸⁸ A. M. Modro, T. A. Modro, *Can. J. Chem.*, **1988**, 66, 1541-1545.

¹⁸⁹ H. Krawczyk, *Synth. Commun.*, **1997**, 27, 3151-3161.

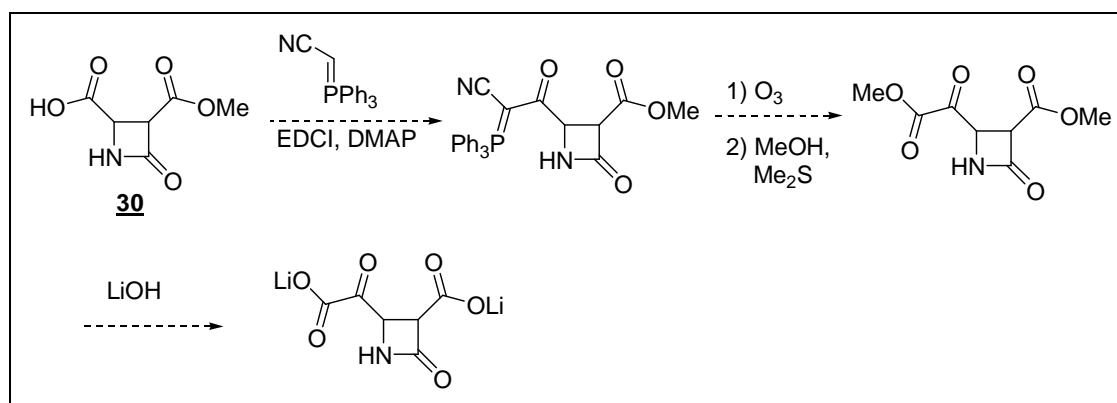


Schéma 115 : synthèse envisagée pour la synthèse d'un analogue hétérocyclique du KG.

Le couplage du cyanophosphorane avec le monoacide **30** en présence d'EDCI et de DMAP, conduirait à l'α-céto-cyanophosphorane. L'ozonolyse de ce composé formerait un α-dicétonitrile qui réagirait *in situ* avec le MeOH pour donner l'α-cétoester. Une hydrolyse classique des esters méthyliques conduirait au cétoacide final.

I.4.1 Synthèse du composé **30**

La synthèse du lactame **30** a été réalisée selon le schéma ci-dessous.

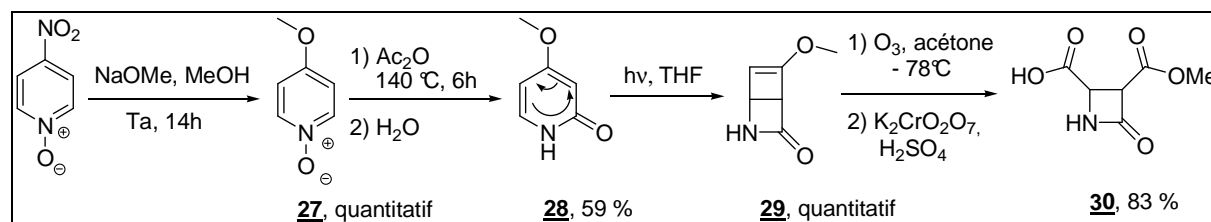


Schéma 116 : synthèse du composé **30**.

La synthèse du composé **29** est décrite dans la littérature à partir de la 4-nitropyridine-N-oxide commerciale. Elle se compose de 3 étapes et a été reproduite au laboratoire¹⁹⁰ : La substitution nucléophile du groupement nitro par le méthylate de sodium conduit au composé **27** avec un rendement quantitatif. L'action d' Ac_2O à reflux suivie d'une hydrolyse permet ensuite de former le composé **28** isolé avec un rendement de 59 %. La réaction suivante a nécessité une purification par chromatographie sur gel de silice suivie d'une recristallisation de **28** afin d'obtenir un produit contenant le minimum d'impuretés. En effet, ces dernières peuvent générer des réactions parasites lors du réarrangement photochimique. L'étape suivante consiste en un réarrangement électrocyclique qui conduit au composé **29** de façon quasi-quantitative. Notons que ce dernier composé ne peut pas être purifié par chromatographie sur gel de silice où il se décompose. Après l'ozonolyse du composé

¹⁹⁰ M. A. Walters, J. J. Shay, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 7575-7578.

bicyclique **29** suivie d'une oxydation de Jones de l'intermédiaire aldéhyde, le composé **30** a été obtenu et isolé avec un rendement de 83 %.

I.4.2 Réaction de Wasserman

Lors des différentes tentatives de couplage du composé **30** avec le cyanophosphorane, nous n'avons observé aucune réaction dans les conditions décrites dans le schéma ci-dessous.

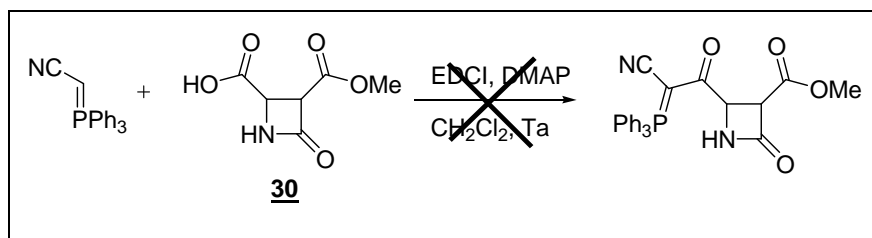


Schéma 117 : synthèse du céto-cyanophosphorane selon la méthode de Wasserman.

De plus, nous avons rencontré des difficultés pour solubiliser le produit **30** dans le CH_2Cl_2 nous obligeant à diluer le milieu réactionnel. Des essais ont été effectués en présence de quelques gouttes de DMF pour rendre le produit plus soluble dans le milieu réactionnel mais les résultats restent décevants : nous n'observons pas de couplage et une décomposition partielle du composé **30**. Nous avons alors envisagé la protection de la fonction amide afin notamment d'améliorer la solubilité et peut être la réactivité de ce composé.

Un premier essai a été effectué en protégeant le lactame par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyl (TBDMS). La protection a été effectuée sur le composé **29** en présence de LDA et de TBDMSCl dans le THF¹⁹¹. Le composé **31** a ainsi été isolé avec un rendement de 54 % (schéma 118). L'ozonolyse suivie de l'oxydation ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour le composé **30** et ont permis de synthétiser le dérivé cyclobutanique **32** avec un rendement de 29 %.

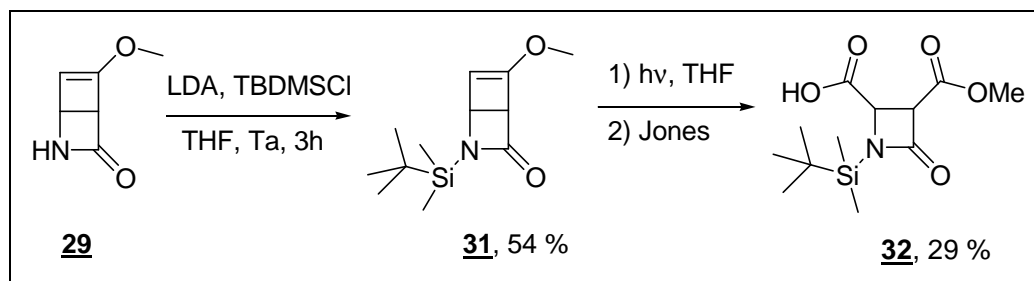


Schéma 118 : Synthèse du composé **32** où le lactame est protégé par un TBDMS.

¹⁹¹ T. Kametani, T. Mochizuki, T. Honda, *Heterocycles*, **1982**, 19, 89-90.

La protection a permis d'obtenir un acide **32** plus soluble dans les solvants organiques et plus facile à purifier. Cependant, nous n'avons pas observé de réaction avec le cyanophosphorane en dépit d'une bonne solubilité de tous les réactifs dans le CH_2Cl_2 (schéma 119).

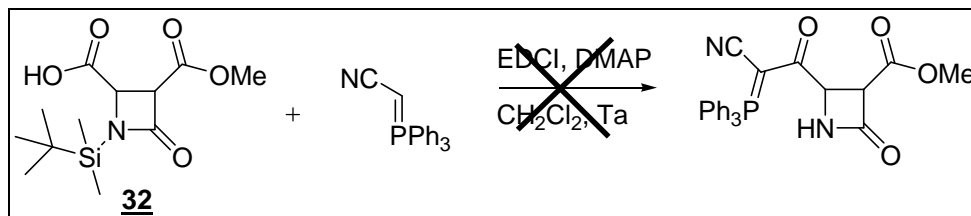


Schéma 119 : tentative de couplage du cyanophosphorane avec le composé **32**.

Ce manque de réactivité peut s'expliquer par le caractère trop encombrant du groupement TBDMS du composé **32**. D'autres groupements protecteurs seraient à envisager tels que des carbamates comme le Z ou le BOC, qui s'élimineraient sélectivement sans altérer l'ester méthylique de la molécule. De plus, il est également probable que les difficultés rencontrées lors du couplage soient liées à la présence d'un hydrogène labile situé sur le cycle lactame, entre les groupements carbonyles de l'amide et de l'ester. La déprotonation par la base ou le cyanophosphorane pourrait être à l'origine des difficultés rencontrées. Quoiqu'il en soit, nous avons manqué de temps pour poursuivre nos efforts dans cette voie de synthèse.

Chapitre II Etude des réactions de transamination

Nous avons évalué tous les analogues du KG synthétisés du type **5** en tant que substrats de trois transaminases : l'AspAT de cœur de porc, l'AspAT d'*E.coli* ainsi que la BCAT d'*E.coli*. Dans le cas où une activité appréciable a pu être mise en évidence, nous avons réalisé la réaction de transamination à l'échelle préparative, nous permettant alors d'obtenir des analogues du Glu de la série L du type **33**.

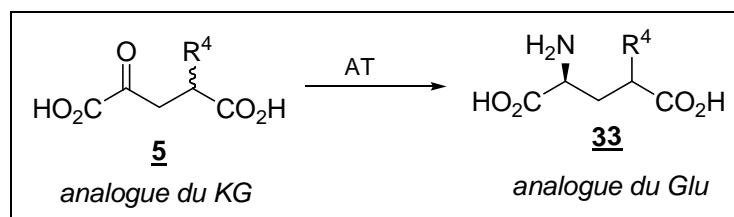


Schéma 120 : transamination des cétoacides du type **5**, substrats d'ATs.

II.1 Disponibilité de l'AspAT et de la BCAT

Grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Kagamiyama (université d'Osaka), nous disposons au laboratoire de souches d'*E.coli* surexprimant les gènes sauvages de l'AspAT et de la BCAT qui sont respectivement AspC et Ilve. Dans le cadre de ma thèse, nous avons produit et purifié l'AspAT d'*E.coli*. Par contre, la production et la purification de la BCAT ont été réalisées par Dr. Mo Xian lors de son stage post-Doctoral au sein de notre équipe. L'AspAT de cœur de porc est, quant à elle, commercialisée chez Sigma-Aldrich.

II.1.1 Production de l'AspAT d'*E.coli*

La souche AspC correspond à une souche d'*E.coli* (TY103) déficiente pour le gène constitutif AspC codant pour l'AspAT et transformée avec le plasmide pUC19-AspC. Ce plasmide contient le gène AspC en aval d'un promoteur fort et possède également un gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les cellules transformées efficacement. L'amplification de la production de l'AspAT correspond à un facteur d'environ 500 par rapport à la souche sauvage (Kamitori, 1987)¹⁹². La production de l'AspAT d'*E.coli* au laboratoire débute par une culture d'une nuit de la souche AspC en présence d'ampicilline. Un extrait brut est alors préparé par broyage des cellules et élimination des débris cellulaires par centrifugation. Deux étapes chromatographiques d'échange d'ion (supports DEAE-Toyopearl® et hydroxyapatite) permettent ensuite d'isoler l'AspAT avec une très bonne pureté. La solution d'enzyme est finalement dialysée avec une solution saturée de sulfate

¹⁹² S. Kamitori, K. Hirotsu, T. Higuchi, K. Kondo, K. Inoue, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, Y. Higuchi, N. Yasuoka, M. Kusunoki, Y. Matsuura, *J. Biochem.* **1987**, *101*, 813-816.

d'ammonium et l'enzyme est stockée sous sa forme précipité. Elle peut être ainsi conservée à 4°C, sans perte d'activité pendant plusieurs années. Le tableau ci-dessous présente à titre d'exemple les résultats obtenus au cours d'une purification à partir de 10 g de cellules (environ 2 L de culture).

Etapes	Volume mL	Activité* UI/mL	[protéines] mg/mL	Act. Totale UI	Act. Spec. UI/mg
1 Extrait brut	196	54	3,8	10600	14
2 DEAE- Toyopearl	36	115	3,3	4100	34
3 Hydroxyapatite	76	62	1,1	4700	56
4 Dialyse (NH₄)₂SO₄	22	242	4,5	5300	54

*1UI est définie comme étant la quantité d'enzyme permettant de convertir 1 µmole de KG (4mM) en Glu en 1 min. en présence d' Asp (40 mM) et dans un tampon KPi 100 mM, pH 7,6.

Tableau 24 : Purification de l'AspAT d'*E. coli*.

Une électrophorèse SDS Page a été réalisée avec des échantillons prélevés à chaque étape de la purification (Figure 39). L'AspAT est bien majoritaire dans l'extrait brut (1) et devient pure au fur et à mesure de l'avancée de la purification.

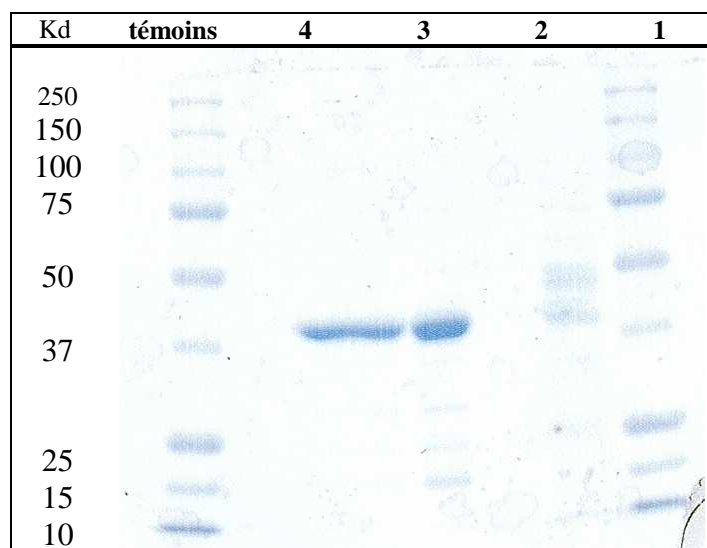


Figure 39 : électrophorèse SDS PAGE, 2 : chromatographie DEAE, 3 : chromatographie hydroxyapatite, 4 : dialyse.

II.1.2 Production de la BCAT d'*E.coli*

La souche surexprimant le gène codant pour la BCAT est la souche TY103 transformée avec le plasmide pUC118-ilve porteur du gène ilve et d'un gène de résistance à l'ampicilline. La BCAT est produite et purifiée selon un protocole analogue à celui décrit pour l'AspAT (Inoue, 1988)¹⁹³. Trois étapes chromatographiques sont effectuées : une chromatographie d'échange d'ion (DEAE-toyopearl®), une chromatographie d'interactions hydrophobes (support butyl-toyopearl®) et enfin une chromatographie d'exclusion stérique (support séphacryl S-200). Le tableau récapitulatif d'une purification et l'analyse électrophorétique sont présentés dans le tableau et la figure suivants.

Etapes	Volume mL	Activité* UI/mL	[protéines] mg/mL	Act. Totale UI	Act. Spec. UI/mg
1 Extrait brut	200	4,4	7,5	850	0,6
2 DEAE-Toyopearl	82	5,4	7,9	442	0,7
3 Butyl-Toyopearl	13	9,1	5,9	118	1,5
4 Séphacryl S-200	18	6,5	3,2	117	2,0

*1UI est définie comme étant la quantité d'enzyme permettant de convertir 1 μ mole d'acide 4-méthyl-2-oxopentanoïque (4mM) en leucine en présence de Glu (40mM) et dans un tampon KPi 100mM, pH 7,6.

Tableau 25 : Purification de la BCAT d'*E. coli*.

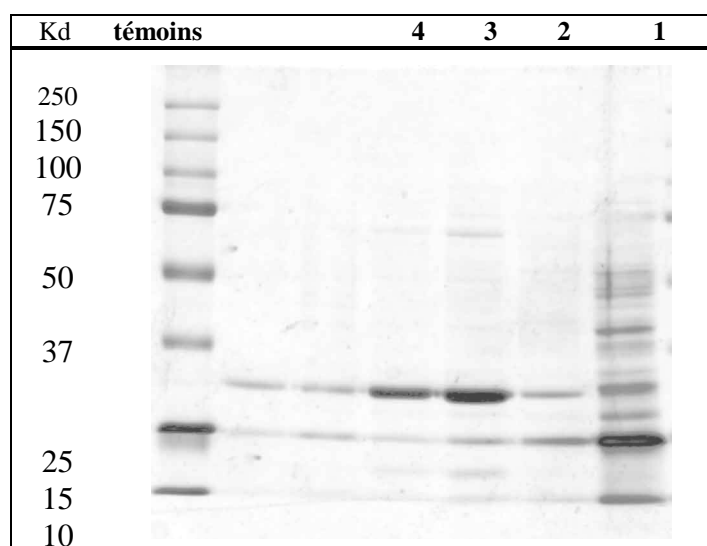


Figure 40 : électrophorèse SDS Page.

¹⁹³ K. Inoue, S. Kuramitsu, K. Aki, Y. Watanabe, T. Tagaki, M. Nishigai, A. Ikai, H. Kagamiyama, *J. Biochem.* **1988**, 104, 777-784.

La BCAT présente, après purification, une activité spécifique environ 25 fois inférieure à celle de l'AspAT. D'autre part, le rendement de cette purification qui n'a été effectuée que 2 fois, n'est pas très bon. L'utilisation de l'enzyme non purifiée reste envisageable pour bénéficier d'une plus grande activité enzymatique (nombre d'unité initiale).

II.2 Etude de la spécificité de substrat de l'AspAT

II.2.1 Protocole de mesure de l'activité enzymatique

L'activité de l'AspAT pour les différents substrats 5, a été étudiée sur la base du modèle de Michaelis-Menten en mesurant la vitesse initiale des réactions enzymatiques.

➤ Modèle de Michaëlis-Menten

Dans ce modèle, l'enzyme E en présence du substrat S conduit à la formation d'un complexe dissociable ES qui libère ensuite le produit de la réaction P (Schéma 121). Rappelons que le mécanisme de transamination est du type ping-pong (cf Chap III, partie bibliographique).

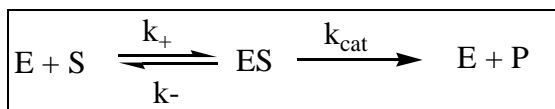


Schéma 121 : mécanisme simplifié d'une réaction catalysée par une enzyme E, suivant le modèle de Michaelis-Menten.

L'enzyme constitue le catalyseur de cette réaction où elle est en concentration très inférieure à celle du substrat. Si bien que l'on atteint vite un état quasi-stationnaire où la concentration en complexe ES (noté : [ES]) demeure constant. Dans ce cas, la vitesse initiale d'apparition du produit P notée V demeure constante un certains temps (**Équation 3**).

$$\boxed{V = k_{cat} \cdot [ES] = V_m \cdot [S] / ([S] + K_m)} \quad \text{Équation 3}$$

Ce modèle permet donc de définir expérimentalement les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique que sont la constante de Michaëlis notée K_m et la vitesse maximale nommée V_m , définis ci-après.

$$\boxed{\begin{aligned} K_m &= [E] \cdot [S] / [ES] = (k^- + k_{cat}) / k^+ \\ \text{et} \\ V_m &= k_{cat} \cdot [Et] \end{aligned}}$$

Avec $[Et] = [E] + [ES]$: concentration totale en enzyme

Équation 4

En traçant V en fonction de $[S]$, on obtient le graphique ci-dessous. Si $V = V_m/2$, alors $K_m = [S]$.

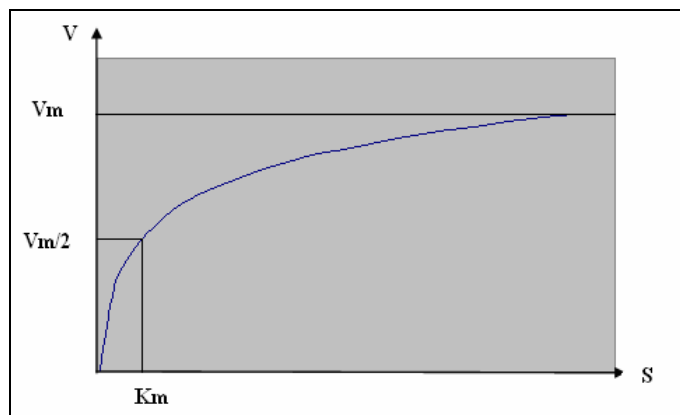


Figure 41 : graphique représentant V en fonction de $[S]$.

De même, en traçant $([S]/V)$ en fonction de $[S]$ (graphique de Hanes-Woolf), on peut déterminer graphiquement les valeurs de K_m et de V_m en déterminant la pente.

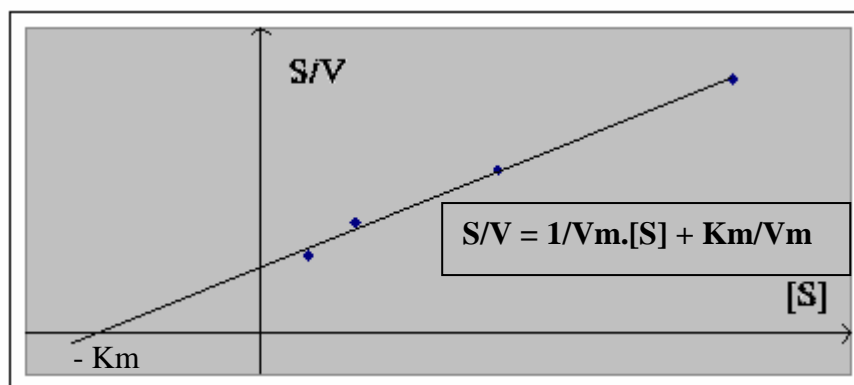


Figure 42 : traitement du graphique de Hanes-Woolf.

C'est donc en mesurant expérimentalement la vitesse initiale de la réaction pour différentes concentrations en substrat, que nous déterminons les paramètres cinétiques K_m et k_{cat} . La constante K_m est proche de la constante de dissociation du complexe ES ($K_s = k^+ / k^-$) dans le cas où k_{cat} est très inférieure aux constantes k^+ et k^- . Ainsi, K_m rend compte de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat. Plus sa valeur est faible, meilleure est l'affinité. Le rapport k_{cat}/K_m permet de rendre compte de l'efficacité globale de l'enzyme. Cependant, dans notre cas, notre objectif synthétique nous amène à accorder une importance particulière à la valeur de k_{cat} . En effet, sous réserve que la valeur de K_m ne soit pas trop élevée, il est a priori possible et préférable d'utiliser une concentration en substrat largement supérieure au K_m (20 mM en général), en assurant ainsi une saturation de l'enzyme ($[ES] = [Et]$) et une vitesse maximale.

➤ Procédure pour déterminer K_m et k_{cat}

Les mesures de vitesses initiales V sont effectuées par spectrophotométrie grâce à une réaction enzymatique auxiliaire faisant intervenir la Malate Deshydrogénase (MDH, EC.1.1.1.37) et le cofacteur NADH (Schéma 122). Ainsi, la MDH catalyse la réduction par le NADH de l'OA dont on peut suivre la disparition à 340 nm (coefficient d'extinction molaire ϵ de $6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Les conditions mises en œuvre font de la transamination l'étape limitante de ce processus. Ainsi la vitesse de disparition du NADH est égale à la vitesse de la réaction de transamination.

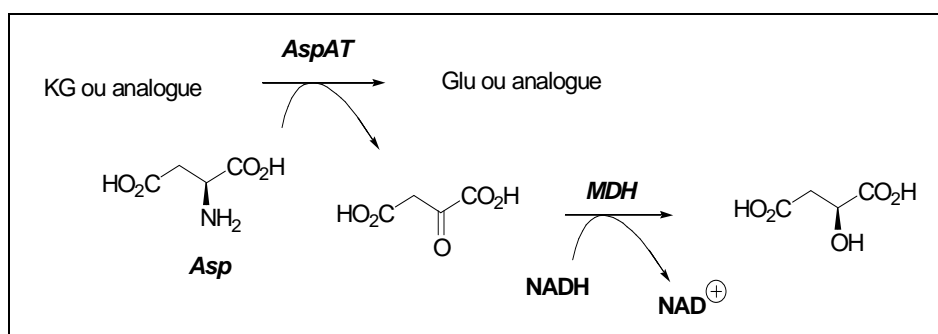


Schéma 122 : protocole de mesure de l'activité de l'AspAT vis-à-vis du KG ou de ses analogues.

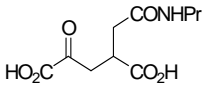
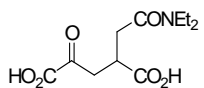
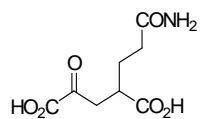
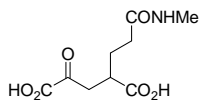
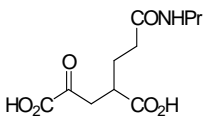
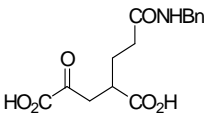
Par ailleurs, nous avons travaillé en concentration fixe et quasi-saturante en Asp (40 mM, $K_m = 4 \text{ mM}$). Les paramètres que nous avons ainsi déterminé sont donc des constantes apparentes réactives à ces conditions expérimentales. Notons que pour l'étude cinétique de chaque analogue du KG, nous avons déterminé les valeurs des paramètres cinétiques relatifs au substrat naturel KG. Les constantes de vitesse k_{cat} et les rapports k_{cat}/K_m seront ainsi exprimés en pourcentage relatif par rapport au substrat naturel. Cette précaution permet de corriger les variations liées à l'emploi de lots et de quantité d'enzymes différents.

De plus, chaque étude s'est accompagnée de calculs d'incertitudes (écarts type par la méthode des moindres carrés et utilisation de la Loi de Gauss pour la propagation des erreurs) sur les valeurs des paramètres cinétiques afin d'avoir une idée de la précision de nos mesures.

II.2.2 Résultats

Les différents analogues de KG dont nous avons décrit la synthèse précédemment, ont été évalués en tant que substrats des AspATs de cœur de porc et d'*E.coli*. Le tableau suivant regroupe l'ensemble des résultats obtenus. Rappelons que les paramètres cinétiques ont été déterminés avec les mélanges racémiques des analogues du KG. Pour comparaison, nous avons également indiqué les paramètres cinétiques pour le KG et les (4*R*) et (4*S*)-4-Méthyl-KG.

Numéro des composés	Substrat	AspAT de cœur de porc			AspAT d' <i>E. coli</i>		
		K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)
/		$0,23 \pm 0,04$	100 ± 3	100 ± 18	$0,23 \pm 0,05$	100 ± 3	100 ± 22
/		$0,19 \pm 0,02$	120 ± 4	149 ± 30	$0,44 \pm 0,02$	50 ± 2	26 ± 5
/		$9 \pm 0,8$	$9 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,05$	$4,8 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$	$0,04 \pm 0,01$
<u>5i</u>		$10,1 \pm 1,9$	$3,1 \pm 0,4$	$0,07 \pm 0,02$	$4,7 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,3$	$0,08 \pm 0,02$
<u>5a</u>		$0,65 \pm 0,12$	33 ± 4	12 ± 3	$0,09 \pm 0,04$	$11,0 \pm 0,8$	27 ± 12
<u>5b</u>		$1,0 \pm 1,3$	$1,7 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,5$	$3,2 \pm 1,2$	$14,2 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
<u>5d</u>		$22,4 \pm 2,4$	$0,11 \pm 0,01$	$0,0011 \pm 0,0003$	$30,1 \pm 1,6$	$1,1 \pm 0,06$	$0,009 \pm 0,002$
<u>5e</u>		$2,2 \pm 0,2$	49 ± 3	$5,1 \pm 1$	$1,8 \pm 0,4$	41 ± 2	$5,2 \pm 1,2$
<u>5g</u>		$2,5 \pm 0,7$	$24,7 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,9$	$0,61 \pm 0,03$	$33,6 \pm 0,6$	$12,7 \pm 2,9$

Numéro des composés	Substrat	AspAT de cœur de porc			AspAT d' <i>E. coli</i>		
		K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)
<u>5k</u>		$24,7 \pm 0,2$	$0,61 \pm 0,06$	$0,006 \pm 0,001$	$6,9 \pm 1,0$	$0,9 \pm 0,1$	$0,033 \pm 0,009$
<u>5l</u>		$5,3 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,1$	$0,07 \pm 0,02$	$11,7 \pm 2,7$	$2,4 \pm 0,5$	$0,05 \pm 0,02$
<u>5m</u>		$10,5 \pm 3,6$	$6,8 \pm 2,1$	$0,15 \pm 0,08$	$4,2 \pm 0,3$	$24,6 \pm 3,2$	$1,3 \pm 0,3$
<u>5n</u>		$5,7 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,2$	$0,07 \pm 0,02$	$4,6 \pm 1,2$	$10,3 \pm 1,7$	$0,5 \pm 0,2$
<u>5o</u>		$6,6 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,1$	$0,06 \pm 0,01$	$14,5 \pm 0,8$	$7,6 \pm 0,6$	$0,12 \pm 0,03$
<u>5p</u>		$2,6 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,2$	$0,31 \pm 0,08$	$2,9 \pm 0,5$	$15,0 \pm 2,2$	$1,2 \pm 0,4$

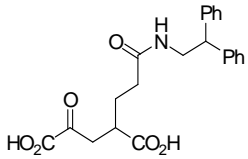
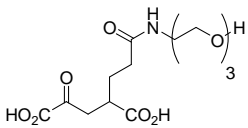
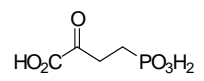
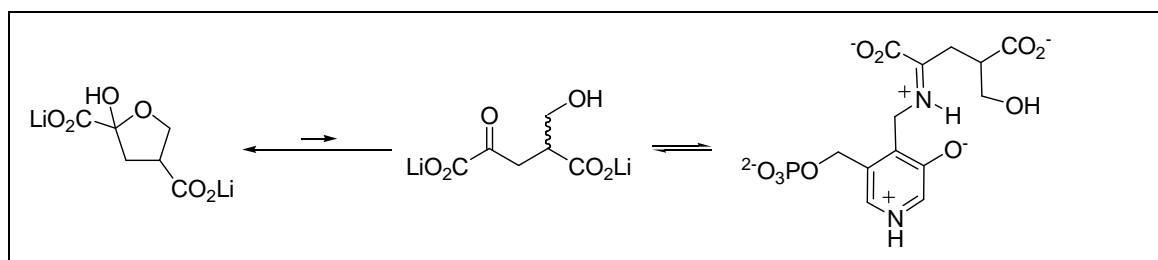
Numéro des composés	Substrat	AspAT de cœur de porc			AspAT d' <i>E. coli</i>		
		K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)
5q		$1,1 \pm 0,2$	$0,33 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,1$	$10,7 \pm 1,2$	$1,1 \pm 0,2$
5r		$5,5 \pm 0,6$	$0,52 \pm 0,04$	$0,022 \pm 0,006$	$15,0 \pm 5,3$	$4,0 \pm 1,3$	$0,06 \pm 0,03$
26		NS*	NS	NS	NS	NS	NS

Tableau 26 : paramètres cinétiques de la réaction de transamination des analogues de KG substitué en position 4 par les AspATs de cœur de porc et d'*E.Coli*. *NS : non substrat.

Il convient, tout d'abord, de remarquer qu'en dépit de quelques différences, les deux enzymes présentent des spectres de substrats similaires. En effet, même si les valeurs de k_{cat} et K_m semblent différentes d'une enzyme à l'autre, les rapports de k_{cat}/K_m sont eux, très proches. De plus, comme nous le verrons par la suite et comme dans le cas des dérivés alkylés, l'AspAT montre une énantiopréférence pour tous les analogues du KG étudiés. Les valeurs des K_m devraient donc être divisées par 2 puisqu'un seul des énantiomères est substrat de l'enzyme. Nous pouvons faire la même remarque pour les rapports de k_{cat}/K_m dont la valeur est en réalité deux fois plus importante que celle mentionnée dans le tableau. Nous constatons que l'introduction de groupements polaires tels qu'un hydroxyle ou un carboxylate, entraîne une faible activité de l'enzyme. En effet, l'affinité pour le 4-(hydroxyméthyl)-KG **5i** est 50 fois plus faible que celle du substrat naturel. De même, le k_{cat} n'est que de 3%. Cette activité faible pourrait être liée à la cyclisation du dérivé **5i** observée en solution aqueuse (schéma 123). En effet, cette cyclisation masque la fonction cétone et peut vraisemblablement perturber la réaction d'addition de la pyridoxamine et la formation de l'intermédiaire cétime.

Schéma 123 : cyclisation du composé **5i**.

Dans le cas du 4-carboxyméthyl-KG **5d**, les valeurs de K_m et k_{cat} sont encore plus défavorables à l'activité enzymatique qui est à peine mesurable. Il est très intéressant de constater que lorsque ces fonctions polaires sont masquées sous la forme d'ester méthylique (**5e**) ou d'éther benzylique (**5a**) pourtant plus encombrant, on observe une restauration de l'activité catalytique qui est 100 à 1000 fois plus importante. Ainsi, les dérivés **5a** et **5e** présentent des K_m égaux à 0,65 et 2,2 mM respectivement et des valeurs de k_{cat} de 33 et 25 %. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus avec les analogues alkylés (cf Chap IV, partie bibliographique) : l'enzyme s'accommode parfaitement de groupements hydrophobes, même volumineux comme l'éther de benzyle en position 4 du KG.

Les résultats obtenus avec l'analogue **5b** montrent que la longueur de la chaîne en position 4 peut être très importante sans perturber de façon dramatique l'activité catalytique. Ainsi, on conserve une valeur de k_{cat} supérieure à 10 % dans le cas de l'enzyme d'*E.coli* tandis que le K_m demeure inférieur à 5 mM.

Le composé **5g** montre une activité tout à fait comparable à celle de son analogue **5e**, montrant une fois de plus, que l'allongement de la chaîne n'est pas nuisible à l'activité.

L'amide **5k** est par contre un très mauvais substrat de l'AspAT. Comme nous l'avons évoqué précédemment à propos de l'analogue **5i**, la cyclisation de ce dérivé peut être grandement responsable de cette activité très faible. Cependant, l'amide tertiaire **5l** qui ne présente pas ce phénomène de cyclisation, n'apparaît pas comme un meilleur substrat. Il est vraisemblable que l'encombrement stérique est, ici, à l'origine de la faible activité.

Les résultats obtenus avec les autres amides **5m-r** sont plus intéressants. Il faut tout d'abord constater que la substitution de la fonction ester par la fonction amide entraîne une baisse d'activité particulièrement évidente si l'on compare les analogues **5g** et **5n** qui diffèrent uniquement par la substitution d'un oxygène par un groupement NH. La polarité et la rigidité plus importantes de la fonction amide sont sans doute à l'origine de cette baisse d'activité. Dans le cas de l'enzyme de cœur de porc, la chute d'activité se traduit par une diminution

d'un facteur 30 de la valeur de k_{cat}/K_m , principalement dû à la baisse du k_{cat} (facteur 14). Cependant, dans le cas de l'enzyme d'*E.coli*, la baisse d'activité est moins marquée et on conserve une valeur de k_{cat} d'environ 10 % par rapport au substrat naturel. Ceci est vrai pour l'ensemble des amides **5m-q**, pour lesquelles l'application synthétique n'a donc pas posé de problème. Il est également intéressant de constater une fois encore, que les amides substituées par les groupements hydrophobes les plus volumineux (**5p** et **5q**) possèdent le plus d'affinité et sont donc les meilleurs substrats de cette série.

Le composé **5r**, porteur d'une chaîne polyéther plus polaire, est un mauvais substrat. Cependant, il conserve une valeur de k_{cat}/K_m de 4% et permet de démontrer une fois encore que l'AspAT accepte des chaînes très longues dans son site actif.

Enfin, il est clair que l'analogue phosphonique **26** n'est pas substrats de l'AspAT.

II.3 Etude de la spécificité de substrat de la BCAT

II.3.1 Mesure de l'activité enzymatique

Comme pour l'AspAT, l'activité de la BCAT d'*E.coli* pour les différents substrats **5** a été étudiée sur la base du modèle de Michaelis-Menten en mesurant la vitesse initiale des réactions enzymatiques à différentes concentrations en analogues du KG **5** et à concentration fixe et saturante en substrat donneur d'amine. L'Asp n'étant pas substrat de la BCAT, le couple Leucine (Leu)/Leucine Déshydrogénase (LeuDH) a été utilisé en tant que réaction auxiliaire consommant le cofacteur NADH (Schéma 124).

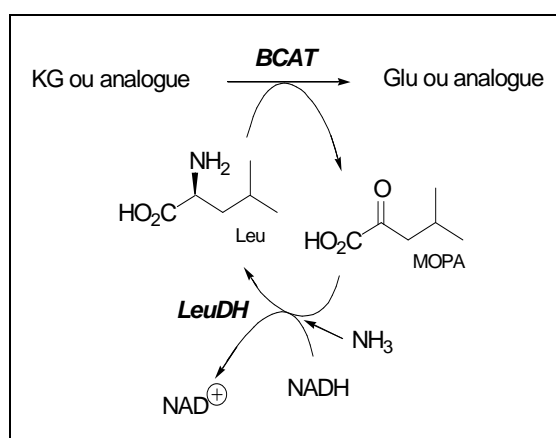


Schéma 124 : protocole de mesure d'activité de la BCAT avec le couple Leu/LeuDH.

Cependant, le coût très élevé de la LeuDH (1 UI par essai = 12,5 euros) a conduit à développer un autre procédé où le couple Glu/GluDH est utilisé à la place de Leu/LeuDH (schéma 125). Nous avons alors adopté ce protocole pour l'étude des analogues du KG, tandis

que le protocole mettant en jeu le couple Leu/LeuDH a été réservé pour les mesures relatives au KG, substrat naturel de référence. Nous avons, par ailleurs, vérifié avec un substrat témoin (4-méthyl-KG) que les 2 protocoles permettaient d'obtenir des valeurs très voisines pour les constantes cinétiques k_{cat} et K_m .

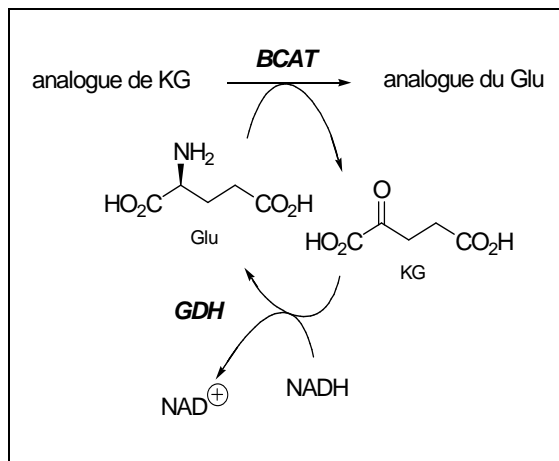


Schéma 125 : protocole de mesure d'activité des analogues de KG avec le couple Glu/GluDH.

De plus, le 4-Me-KG a servi de substrat de référence lors de l'étude de chaque analogue pour la détermination d'un k_{cat} relatif. Connaissant la valeur du k_{cat} relatif du 4-Me-KG par rapport au KG, nous avons finalement estimé pour chaque analogue 5 le k_{cat} relatif par rapport au KG. Ces calculs entraînent des incertitudes plus grandes que celles obtenues pour les mesures effectuées dans le cas de l'AspAT.

II.3.2 Résultats

Le tableau suivant regroupe l'ensemble des résultats obtenus. Rappelons ici encore que les paramètres cinétiques ont été déterminés avec les mélanges racémiques des analogues du KG.

Numéro des composés	Substrat	BCAT d' <i>E.coli</i>		
		K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)
/		$0,23 \pm 0,04$	100 ± 3	100 ± 18
<u>5i</u>		$8,5 \pm 1,3$	$27,4 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,4$
<u>5a</u>		$9,7 \pm 1,2$	266 ± 5	$6,3 \pm 2$
<u>5b</u>		$8,0 \pm 1,2$	$61,2 \pm 15,9$	$1,7 \pm 1,6$
<u>5d</u>		NS*	NS	NS
<u>5e</u>		$2,6 \pm 0,2$	130 ± 11	$11,5 \pm 0,3$
<u>5g</u>		$1,6 \pm 0,3$	$37,6 \pm 6,9$	$5,4 \pm 1,1$
<u>5h</u>		NS	NS	NS
<u>5l</u>		$7,9 \pm 2,2$	$9,1 \pm 3,1$	$0,3 \pm 0,3$

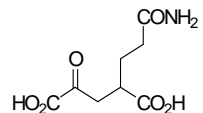
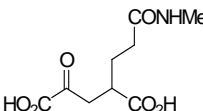
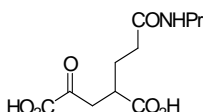
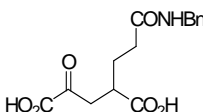
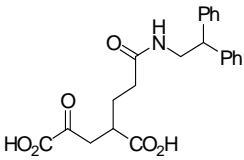
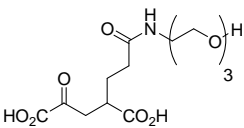
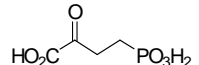
<u>5m</u>		NS	NS	NS
<u>5n</u>		NS	NS	NS
<u>5o</u>		NS	NS	NS
<u>5p</u>		$33,5 \pm 18,7$	$46,2 \pm 26,4$	$0,3 \pm 0,1$
<u>5q</u>		NS	NS	NS
<u>5r</u>		NS	NS	NS
<u>26</u>		$6,3 \pm 0,8$	127 ± 11	$4,6 \pm 2,3$

Tableau 27 : paramètres cinétiques de la réaction de transamination des analogues de KG fonctionnalisés en position 4. *NS :non substrat.

D'une manière générale, les analogues du KG fonctionnalisés en position 4 sont moins bons substrats que les analogues alkylés décrits dans la partie I en particulier dans le cas des dérivés comportant une fonction amide pour lesquels une activité n'a pu être mesurée qu'avec le composé **5p**.

La BCAT manifeste une faible activité vis-à-vis de l'alcool **5i**, sans doute en raison du problème de cyclisation de ce dérivé évoqué précédemment.

L'éther benzylé **5a** constitue cependant un très bon substrat de l'enzyme avec une valeur de k_{cat}/K_m proche de 10 %. Cette valeur est à rapprocher de celle déterminée précédemment pour l'analogue 4-Bn-KG ($k_{cat}/K_m = 12\%$) qui confirme la tolérance de l'enzyme vis-à-vis des groupements hydrophobes et volumineux en position 4. Il est intéressant cependant de voir que la valeur du K_m pour ce composé était plus faible d'un facteur 10 dans le cas de l'AspAT. Ce résultat confirme la diminution de l'affinité avec la taille du substituants mis en évidence avec les dérivés alkylés.

De même, une diminution d'activité est notée dans le cas du dérivé polyéther **5b**. Cependant, on conserve une valeur de k_{cat} de 60 % pour ce dérivé, ce qui reste tout à fait convenable pour une application synthétique.

Comme dans le cas de l'AspAT, on constate que le passage de l'acide carboxylique **5d** à l'ester méthylique **5e** permet de restaurer l'activité enzymatique. Ce qui montre encore que la BCAT, comme l'AspAT, a une préférence pour les groupements hydrophobes ou peu polaires. De même, l'ester **5g** est un assez bon substrat de la BCAT.

Les résultats obtenus avec les amides sont plus décevants : seuls les analogues **5l** et **5p** ont permis de mettre en évidence une activité modeste.

Cependant, la BCAT, contrairement à l'AspAT, montre une bonne activité vis-à-vis de l'analogue phosphonique **26** et offre donc un accès à l'AP4. Notons que d'après un travail annexe réalisé au laboratoire, une activité du même ordre de la BCAT a été mise en évidence vis-à-vis de l'analogue méthylphosphonique, précurseur de la phosphinothricine (L-PPT, Schéma 126).

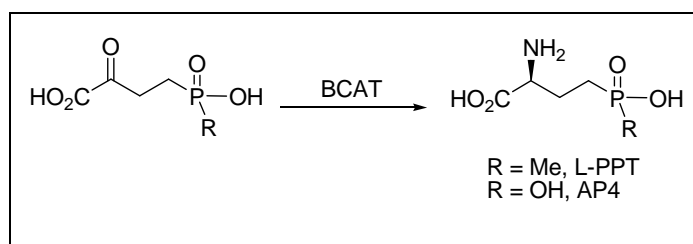


Schéma 126 : synthèse d'analogues phosphorylés du KG.

A ce jour, nous ne pouvons dire si la BCAT présente une énantiosélective marquée vis-à-vis de ces analogues. Cela reste à déterminer, notamment via des synthèses à l'échelle préparative que nous n'avons pas eu le temps d'effectuer.

Chapitre III Préparation des analogues du Glu par transamination enzymatique avec l'AspAT

III.1 Procédé biocatalytique

Comme nous l'avons vu précédemment, l'AspAT a montré une préférence très marquée dans le cas d'analogues du KG substitués en position 4. Le même type d'énantiosélectivité a été mise en évidence avec les cétoacides de type **5**. Le dédoublement cinétique des mélanges racémiques a donc été effectué. En arrêtant la réaction à un taux de conversion d'environ 45 % afin qu'un seul des énantiomères soit transformé par l'AspAT, nous avons obtenu les analogues du Glu correspondants avec d'excellents excès énantiomériques (ee > 95 %) et diastéréoisomérique (de > 95 %). Compte tenu des résultats précédemment obtenus avec les dérivés alkylés en position 4, nous avons postulé que les nouveaux analogues du Glu possèdent une configuration relative L-(2,4)-syn. Ceci a pu être démontré dans le cas du composé **33d**.

Nous avons appliqué le procédé catalytique mis au point au laboratoire pour la préparation d'analogues du Glu alkylés à l'échelle préparative. Ce procédé met en jeu l'ACS comme aminoacide donneur, facilement produit par oxydation de la cystine¹⁹⁴. Comme nous l'avons expliqué dans la partie bibliographique, ce composé a l'avantage de former, après transamination, un intermédiaire instable qui se décompose instantanément en pyruvate entraînant ainsi le déplacement d'équilibre de la réaction de transamination catalysé par l'AspAT d'*E.coli* (schéma 127).

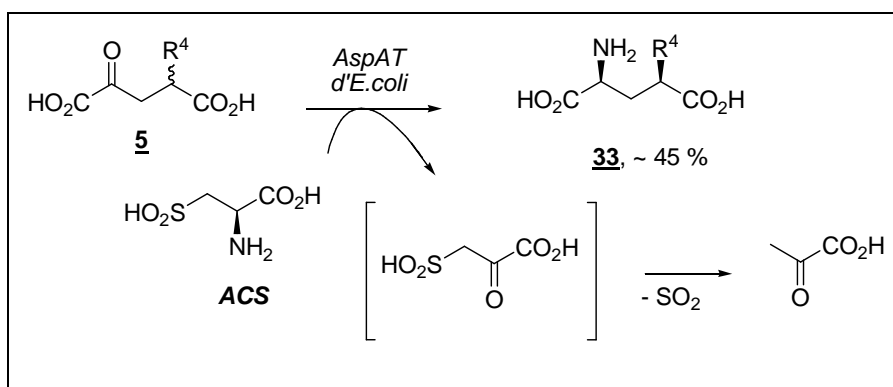


Schéma 127 : procédé de transamination pour le dédoublement cinétique des analogues du KG et la préparation d'analogues du Glu de configuration L-(2,4)-syn.

¹⁹⁴ R. Emiliozzi, L. Pichat, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1959**, 1887.

Le suivi de la réaction se fait par dosage enzymatique de l'analogue du KG résiduel et du pyruvate produit au cours de la réaction. Le dosage du KG se fait suivant le protocole utilisé pour les mesures d'activité de l'AspAT (Schéma 128). Ainsi, en utilisant la MDH en tant qu'enzyme auxiliaire, la quantité de NADH (initialement en excès) consommé est égale à la quantité d'analogue du KG résiduel dans la solution.

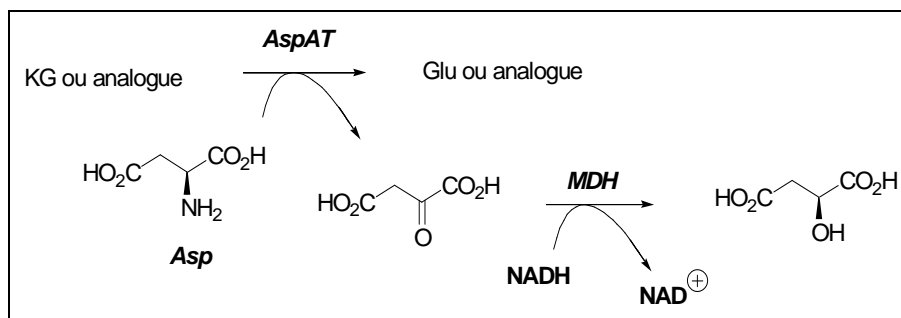


Schéma 128 : protocole pour le dosage de l'analogue du KG résiduel au cours de la transamination enzymatique.

Le pyruvate est, quant à lui, dosé avec la Lactate Déshydrogénase (LDH) comme le schéma ci-dessous le décrit. Ainsi, la quantité de NADH consommé est égale à celle de pyruvate produit lors de la transamination. Ce dosage n'est cependant fiable que pour des transaminations assez rapides (quelques heures au maximum) car le pyruvate a tendance à se dégrader dans le milieu réactionnel.

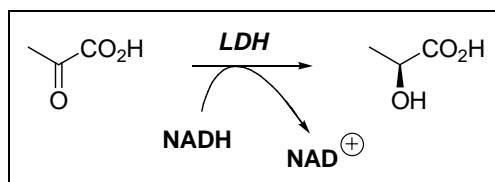


Schéma 129 : protocole pour le dosage du pyruvate formé lors de la transamination enzymatique.

Lorsque le taux de conversion atteint 45 %, le milieu réactionnel est déposé sur une colonne de résine fortement acide (du type Dowex 50) afin de séparer l'analogue du Glu des autres réactifs et produits de la réaction. Dans un premier temps la colonne est lavée à l'eau pour éliminer toutes les espèces neutres comme le cétoacide en excès (enantiomériquement enrichi), le pyruvate et l'ACS qui présente un point isoélectrique plus bas que les analogues du Glu (Schéma 130). Une seconde élution avec une solution aqueuse d'ammoniaque 1M permet de décrocher l'analogue du Glu désiré.

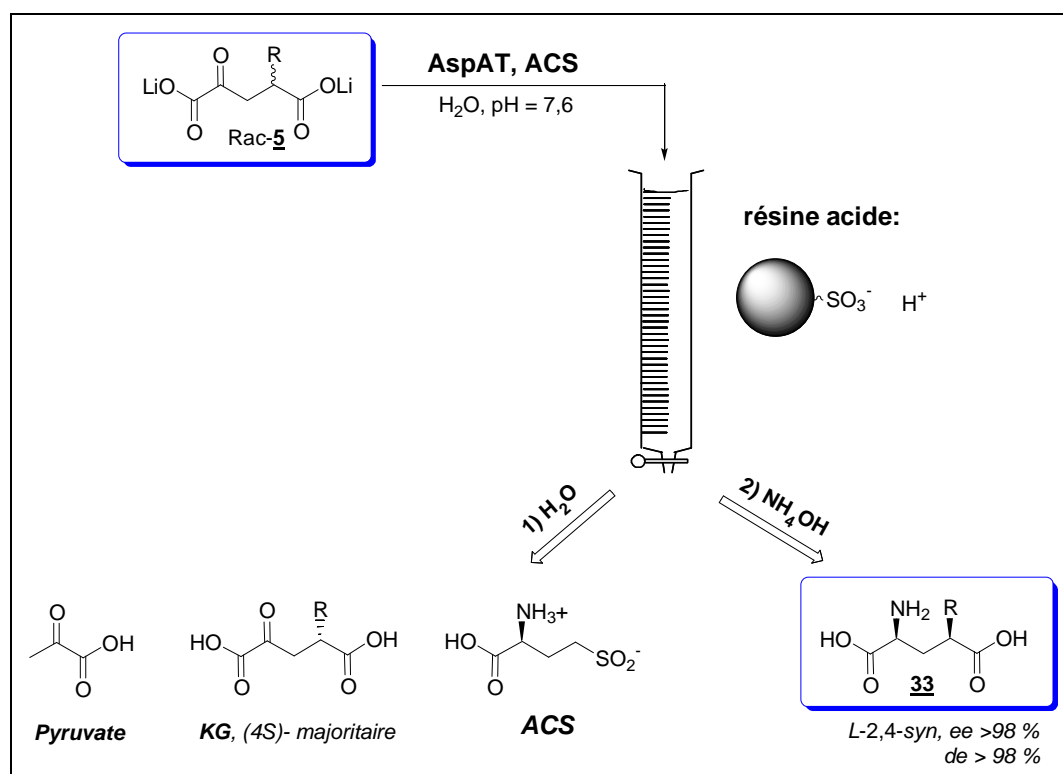


Schéma 130 : purification sur résine acide après transamination.

Une seconde purification sur une colonne de résine basique type DOWEX 1 ou 2 (équilibré avec des ions acétates) permet d'obtenir l'acide aminé souhaité avec une très grande pureté, indispensable pour les tests biologiques : l'acide aminé sous forme anionique ($\text{pH} > 7$) est tout d'abord adsorbé sur la résine cationique avant d'être sélectivement élué en utilisant un gradient d'acide acétique, formique ou éventuellement plus fort (TFA ou HCl).

III.2 Résultats

La plupart des cétoacides **5** substrats de l'AspAT d'*E.coli* ont été mis en réaction suivant le protocole décrit précédemment. Les analogues du Glu correspondants **33** ont tous été obtenus avec des rendements de l'ordre de 40 % après purification.

Le tableau ci-après présente l'ensemble des analogues du Glu synthétisés au cours de cette thèse ainsi que les pouvoirs rotatoires correspondants $[\alpha]_D^{25}$.

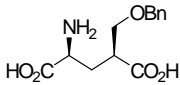
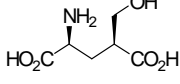
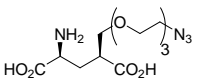
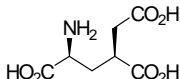
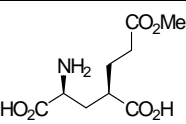
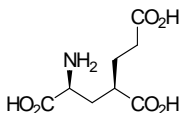
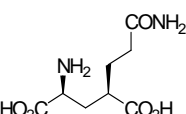
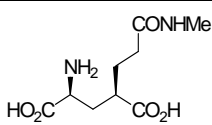
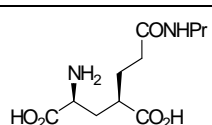
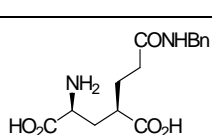
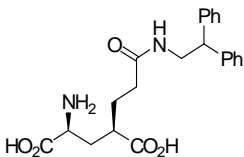
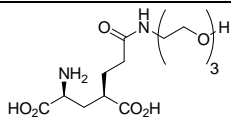
Numéro des composés	Analogues du Glu	$[\alpha]_D^{25}$ (HCl 6N)
<u>33a</u>		+ 31
<u>33i</u>		+ 26
<u>33b</u>		+18
<u>33d</u>		+ 8
<u>33g</u>		+ 29
<u>33s</u>		+ 6,4
<u>33m</u>		+ 34
<u>33n</u>		+ 30
<u>33o</u>		+ 27
<u>33p</u>		+ 22
<u>33q</u>		+ 17
<u>33r</u>		+ 19

Tableau 28 : nouveaux analogues du Glu fonctionnalisés **33** synthétisés au cours de cette thèse.

Comme le cétoacide **5i** n'est pas un bon substrat de l'AspAT, l'analogue (2*S*,4*S*)-4-hydroxyméthyl)-Glu **33i** a été préparé par hydrogénolyse de l'acide aminé benzylé **33a** (Schéma 131).

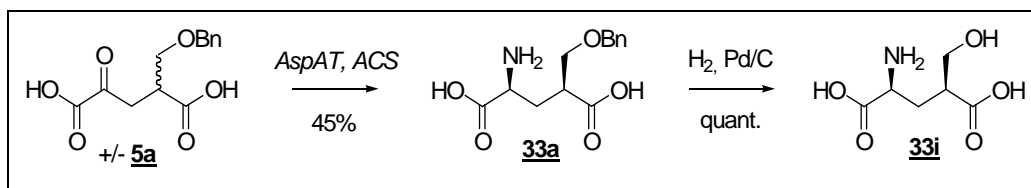


Schéma 131 : obtention du dérivé 4-hydroxyméthyl-Glu à partir du cétoacide **5a**.

Le (2*S*,4*S*)-4-carboxyméthyl-Glu **33d** a été obtenu à partir de l'ester **5e** qui est un bon substrat de l'AspAT, contrairement au 4-carboxyméthyl-KG **5d**. Le Glu fonctionnalisé par l'ester méthylique n'a cependant pas pu être isolé. En effet, le produit de la transamination subit une réaction de cyclisation catalysée en milieu basique. Ainsi, l'élution de la résine acide avec une solution d'ammoniaque permet d'isoler le dérivé lactame **34** (Schéma 132). L'étude de cet analogue par RMN ^1H nous a permis de confirmer la stéréochimie proposée pour ce nouvel analogue. En effet les constantes de couplage mesurées pour les 2 H en α des acides carboxyliques indiquent un positionnement pseudo-axial compatible uniquement avec une configuration *cis* du lactame. Le dérivé 4-carboxyméthyl-Glu **33d**, a pu être isolé après une hydrolyse acide du milieu réactionnel avant la purification sur résine acide.

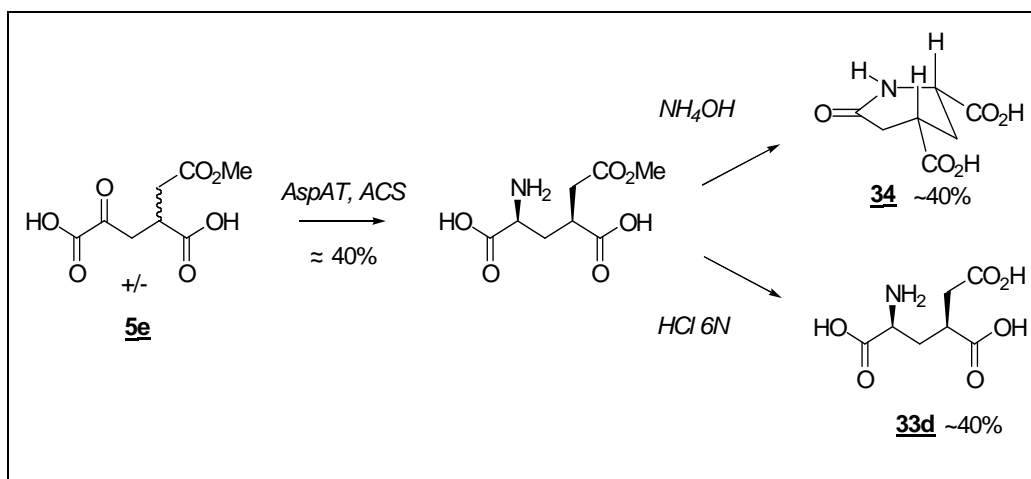


Schéma 132 : obtention du dérivé **33d**.

Dans le cas du cétoacide **5g**, qui présente une chaîne plus longue en position 4, aucune cyclisation de l'analogue du Glu correspondant n'a été observée. Pour éviter l'hydrolyse en milieu basique (lors de l'élution de la résine acide), l'acide aminé **33g** a été obtenu en déposant directement le milieu réactionnel sur une résine basique et après élution avec un gradient d'AcOH (Schéma 133). Comme dans le cas du composé **33d**, le composé **33s** a été

obtenu en effectuant une hydrolyse acide du milieu réactionnel de la transamination du cétoacide **5g**, avant la purification sur résine acide.

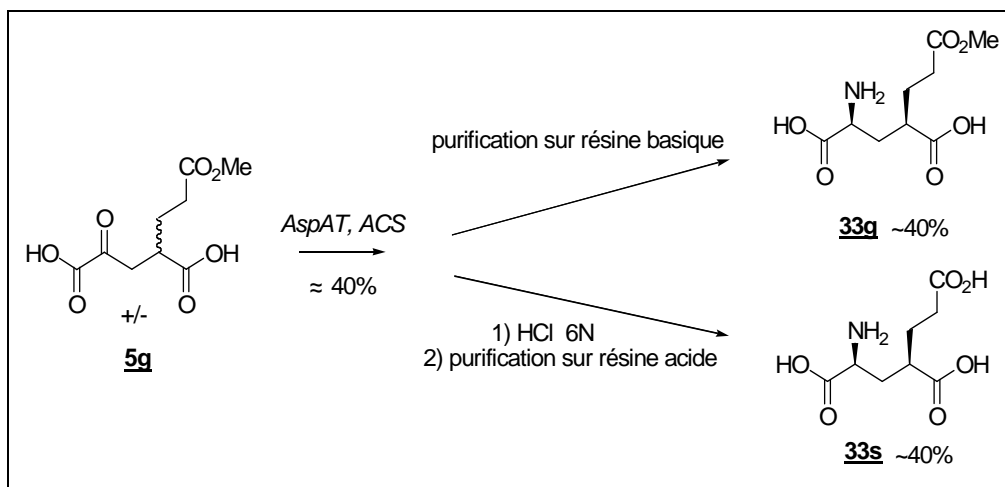


Schéma 133 : obtention des analogues **33g** et **33s**.

Chapitre IV Synthèse de nouveaux analogues du Glu par cycloaddition à partir du composé 33b

IV.1 Introduction : choix du dérivé 33b comme précurseurs

Parmi les différentes fonctions (éther, ester, amide) que nous avons introduites sur les substituants en position 4 des analogues du Glu, la fonction éther nous a paru la mieux adaptée pour assurer une liaison stable avec une autre molécule, un polymère ou un support solide. De plus, les analogues 5a et 5b possédant une fonction éther, se sont révélés être de bons substrats de l'AspAT et de la BCAT, contrairement aux amides pour lesquels nous avons observé des activités globalement plus faibles et très dépendantes du substituant de l'azote amidique. Pour assurer la liaison de l'analogue du Glu à un polymère, nous avons, en parallèle, fait le choix d'utiliser la réaction de cycloaddition d'Huisgen entre un azoture et un alcyne. Les premiers résultats obtenus à partir de l'analogue 33b sont décrits dans la suite du chapitre.

IV.2 Réaction de Huisgen et click chemistry

L'analogue 33b comporte donc un groupement azoture terminal dans le but de faire de la « Click Chemistry » (Sharpless, 2001)¹⁹⁵. La cycloaddition [3+2] 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture et un alcyne, catalysé par du cuivre I (Cu^{I}), permet de former exclusivement un triazole (1,4)-disubstitué¹⁹⁶ (Schéma 134). De plus, cette réaction s'avère compatible avec de nombreux groupements fonctionnels tels que les acides et les amines non protégées. D'autre part, cette réaction est peu sensible à la nature du solvant et donne généralement d'excellents rendements.

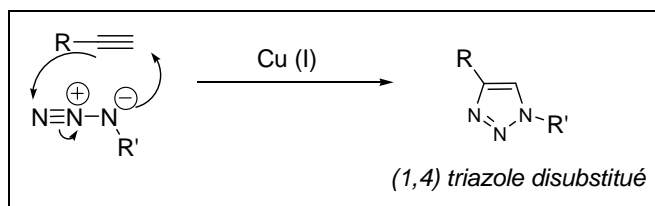


Schéma 134 : cycloaddition de Huisgen entre un azoture et un alcyne, réaction catalysée par $\text{Cu}(\text{I})$.

Des sels de $\text{Cu}(\text{I})$ tel que l'iodure de cuivre peuvent être utilisés mais l'espèce Cu^+ est généralement générée *in situ* par addition d'une solution d'acide ascorbique fraîchement préparée à une solution aqueuse de sulfate de Cuivre.

¹⁹⁵ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021.

¹⁹⁶ V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Folkin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.

Le mécanisme proposé pour la catalyse par le cuivre comporte plusieurs étapes et commence par la formation d'un complexe acétylure-Cu^I qui réagit avec l'azoture (Figure 43).

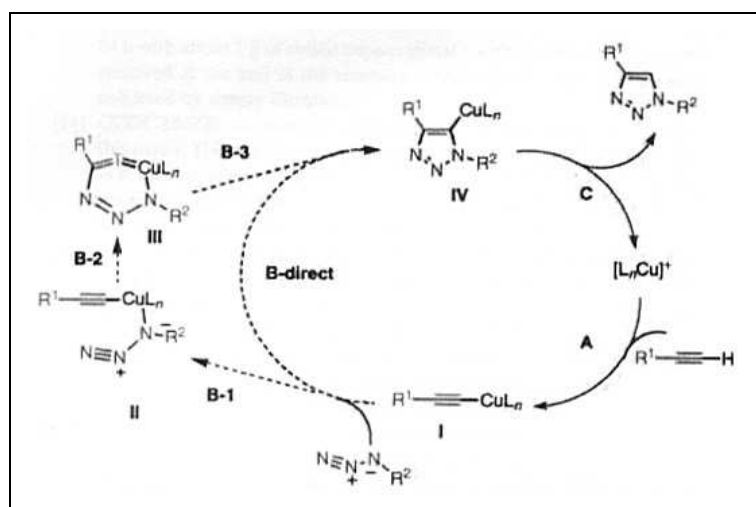


Figure 43 : cycle catalytique proposé pour la réaction de cycloaddition d'Huisgen¹⁹⁷.

IV.3 Vers la préparation d'un substrat donneur lié à un polymère

IV.3.1 Préparation des composés **5t** et **33t**

Comme nous l'avons précédemment évoqué dans la partie projet (partie II), un de nos objectifs était la préparation d'un glutamate lié à un support polymérique (soluble ou insoluble) utilisable comme donneur dans des réactions de transamination à grande échelle. Nous avons envisagé la liaison de l'analogue **33b** à une chaîne PEG. Avant d'entreprendre la synthèse sur un polymère de poids moléculaire élevé, nous avons voulu valider notre approche avec la molécule **35**.

Le composé **35** a été préparé en une étape par réaction entre le méthoxy-éthoxy-éthanol et le bromure de propargyle selon le schéma ci-dessous.

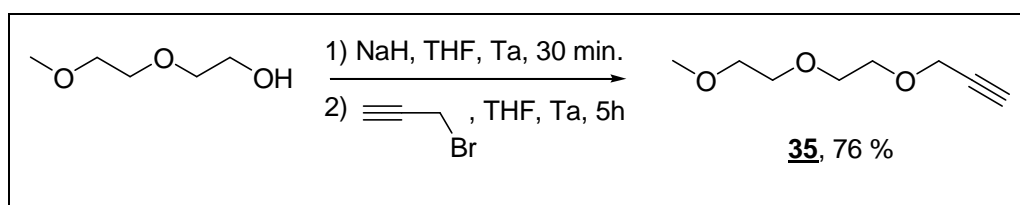
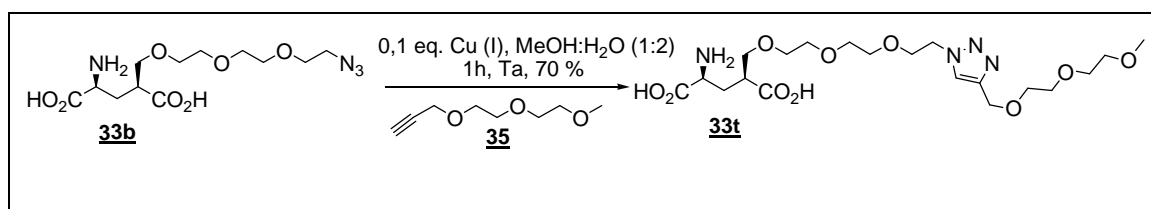


Schéma 135 : synthèse du composé **35**.

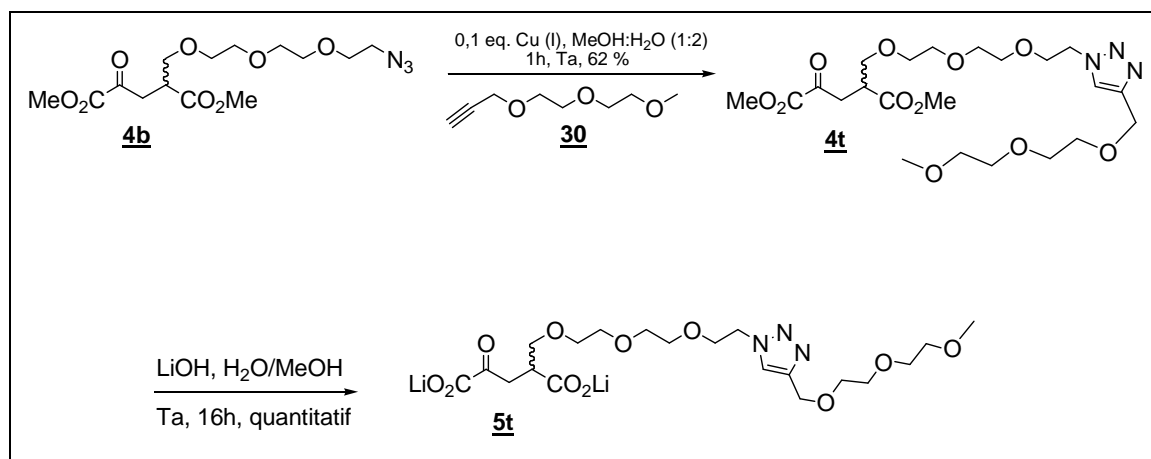
Le schéma suivant décrit les résultats obtenus pour la préparation de l'analogue du Glu **33t**.

¹⁹⁷ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.

Schéma 136 : synthèse d'un nouvel analogue du Glu **33t**.

Nous avons obtenu après 1h de réaction à Ta, le nouvel analogue du Glu **33t** avec un rendement de 70 %. Ce composé a été facilement séparé du cuivre, de l'acide ascorbique et de ses produits d'oxydation sur colonne de résine fortement acide.

Nous avons également réalisé la réaction de cycloaddition à partir du cétoacide **4b**, précurseur du composé **33b**. De la même façon, nous avons obtenu le cétoester **4t** isolé avec un rendement plus faible de 62 % (schéma 137). Le cétoacide **5t** est ensuite obtenu après l'hydrolyse des esters en présence de LiOH comme cela a été décrit précédemment.

Schéma 137 : synthèse du cétoacide **5t**.

Notons que ces réactions de cycloaddition n'ont pas été optimisées. L'influence du solvant et du type de catalyseur pourrait faire l'objet d'une étude plus approfondie.

IV.3.2 Activité de l'AspAT d'*E.coli* vis-à-vis des dérivés **5t** et **33t**

Il nous a paru intéressant d'évaluer l'activité de l'AspAT vis-à-vis des molécules **5t** et **33t**. Le cétoacide **5t** est un substrat modéré de l'AspAT d'*E.coli* avec un K_m de 8,2 mM et un k_{cat} de 11 %. Si l'on compare au précurseur **5b** (K_m = 3,2 mM, k_{cat} = 14,2 %), on note une légère augmentation du K_m pour **5t**. Par contre les valeurs de k_{cat} demeurent très proches, ce qui confirme, une fois encore, l'acceptation par l'AspAT de chaînes très longues. Afin de confirmer ces résultats, nous avons aussi étudié la réaction de transamination en utilisant l'analogue **33t** comme donneur d'amine en présence du KG. Cette expérience nous a permis d'évaluer la constante d'équilibre de la réaction de transamination (Schéma 138).

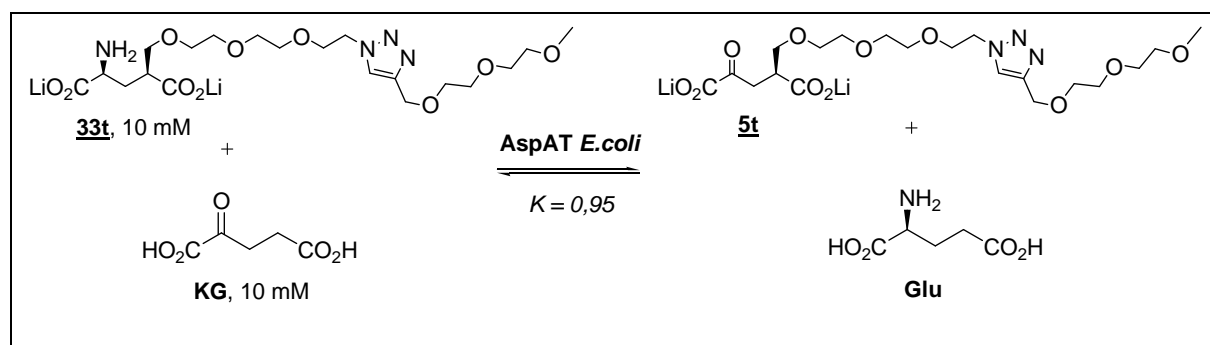


Schéma 138 : protocole de mesure de la constante d'équilibre de la transamination du KG avec le dérivé **33t** comme donneur.

Lors de cette étude, l'évolution de la concentration en KG a été mesurée par dosage enzymatique de ce composé avec la GluDH à intervalle de temps régulier. De plus, en parallèle, la même étude mettant en jeu les substrats naturels de l'AspAT (Asp comme donneur et KG comme accepteur) a été effectuée dans les mêmes conditions (Figure 44). Deux expériences témoins ont également été réalisées en absence d'enzyme.

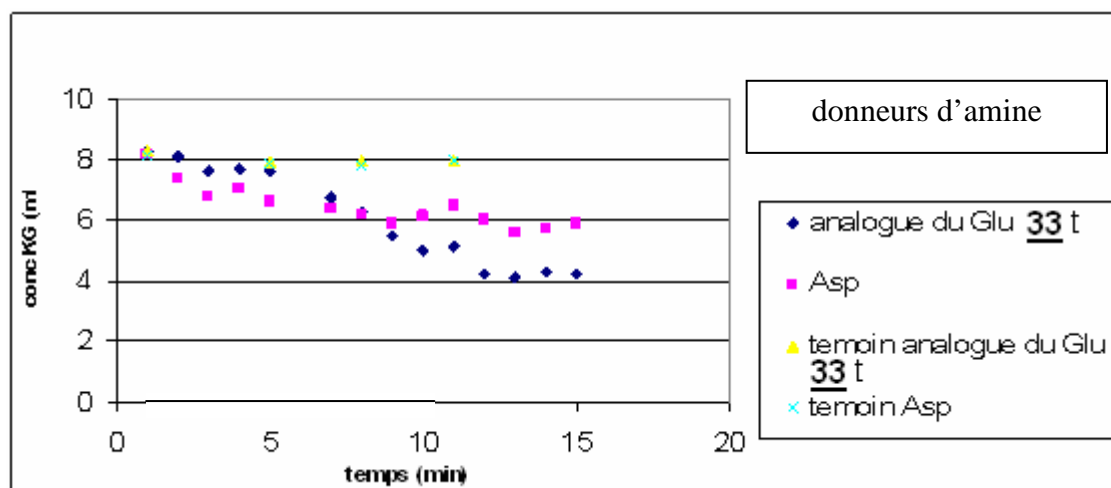


Figure 44 : évaluation de la concentration en KG en fonction du temps.

La réaction de transamination catalysée par l'AspAT d'*E.coli* en présence de l'analogue **33t** et du KG présente une constante d'équilibre égale à 0,95. Celle de la réaction conduite entre l'Asp et le KG est 4 fois inférieure avec une valeur de 0,23. Cette valeur déterminée dans ces conditions est proche de la valeur de 0,16 citée dans la littérature¹⁹⁸. De plus, nous avons estimé que la vitesse de la réaction mettant en jeu le composé **33t** est égale à environ 2 % de celle de la transamination réalisée avec les substrats naturels de l'AspAT. Cette valeur est légèrement supérieure au rapport k_{cat}/K_m relatif mesurée pour le cétoacide **5t** et égal à 0,3 %.

¹⁹⁸ P. M. Manucci, N. Dioguardi, *Clin. Chim. Acta*, **1966**, 14, 215.

Ainsi, l'AspAT s'accommode de la présence du cycle triazole et de la chaîne polyéther supplémentaire qui se situe vraisemblablement à l'extérieur du site actif comme nous le verrons dans la seconde partie de ce mémoire consacrée à la modélisation moléculaire du site actif de l'enzyme. Ce résultat laisse penser que la liaison de **33b** à une chaîne PEG de poids moléculaire élevé, pourrait permettre de conserver une activité catalytique.

Avant de poursuivre dans ce sens, nous avons pensé que l'affinité de l'enzyme pour ce type de dérivés et donc l'activité globale pourrait être améliorée en choisissant une chaîne plus hydrophobe et mieux accommodée dans le site actif, comme le montrent les résultats obtenus avec le dérivé **5a**. Nous avons donc orienté nos efforts vers la synthèse de l'analogue **5c** dont une partie a été décrite au chapitre I mais qui n'a pas pu être menée à son terme, faute de temps (Schéma 139).

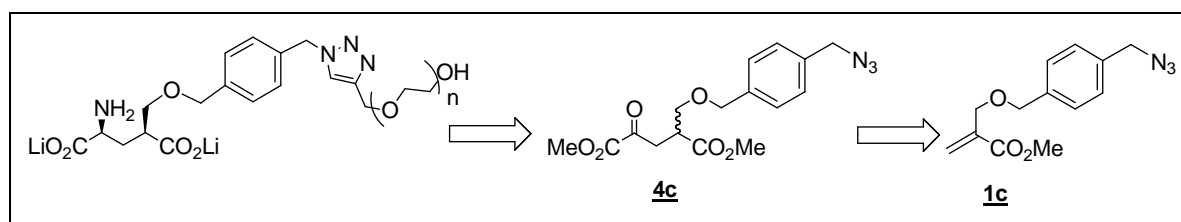


Schéma 139 : synthèse d'un nouvel analogue du Glu, substrat potentiel de l'AspAT d'*E.coli*.

IV.3.3 Essais d'immobilisation non covalente

A. Principe et stratégie

Une autre réaction de cycloaddition nous a permis d'introduire un groupement acridone dans le but de supporter le Glu par interactions hydrophobes sur un support fonctionnalisé tel que de la silice C₁₈. En plus d'être hydrophobe, l'acridone offre l'avantage d'être un groupement fortement fluorescent, ce qui permet de vérifier, à l'œil nu ou sous lampe UV, la fixation de l'analogue du Glu sur le support. Ainsi, en suspension dans l'eau, l'analogue immobilisé sur le support solide pourrait présenter sa partie aminée soluble vers la phase aqueuse et être ainsi accessible à l'enzyme (Figure 45).

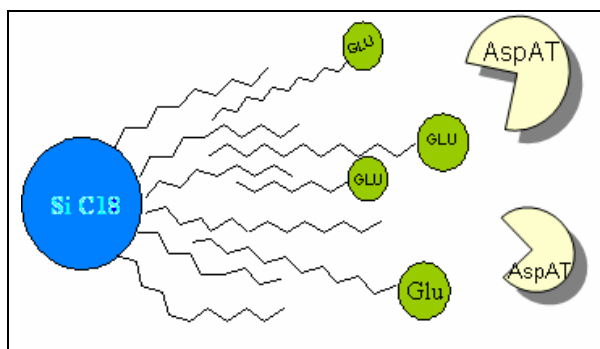


Figure 45 : immobilisation du Glu sur de la silice-C₁₈ par interactions hydrophobes entre l'acridone et les chaînes alkyles.

La silice C₁₈ classique ne présente qu'une porosité de 60 Å, alors que le diamètre de l'enzyme est de 90-100 Å. Pour rendre un maximum de substrat donneur accessible à l'AspAT, il est nécessaire d'avoir de la silice avec une porosité supérieure à 200 Å. Ce type de silice est notamment utilisé pour la purification par HPLC de protéines présentant des poids moléculaires importants. Nous avons pu nous procurer des échantillons de silice fonctionnalisée par des chaînes alkyles ou des groupements phényles présentant une porosité moyenne de 300 Å (Sigma-Aldrich, Supercosil[®] LC-318 et 3DP) et une capacité d'environ 24 mmol pour 100g de silice qui pourrait être adaptée à notre étude.

B. Synthèse du composé **37**

La synthèse du composé **37** a été effectuée en deux étapes (Schéma 140). La première est la réaction de l'acridone sur le 1,6-dibromohexane en présence de NaH¹⁹⁹. Cette réaction s'effectue en présence d'un large excès de réactif dibromé pour favoriser une mono-substitution. La seconde étape consiste à faire réagir l'alcool propargylique sur le composé **36**, toujours en présence de NaH. L'alcyne est finalement obtenu avec un rendement global de 45 %.

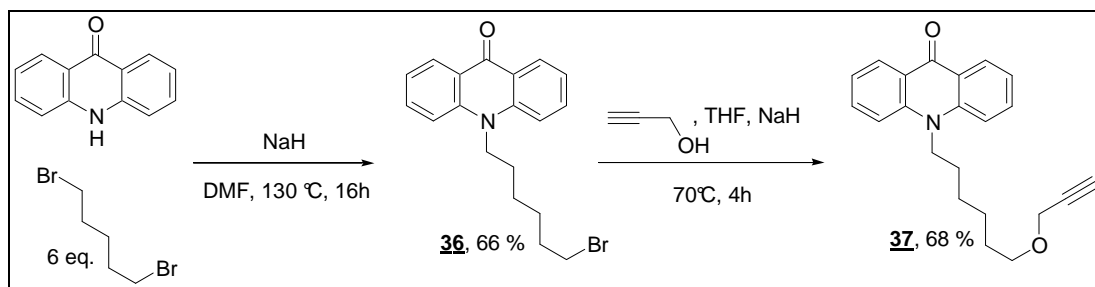


Schéma 140 : synthèse de l'alcyne **37**.

C. Préparation de l'analogue **33u**

La réaction de cycloaddition entre l'analogue **33b** et l'alcyne **37** a permis d'observer la formation d'un nouveau composé correspondant vraisemblablement au **33u**.

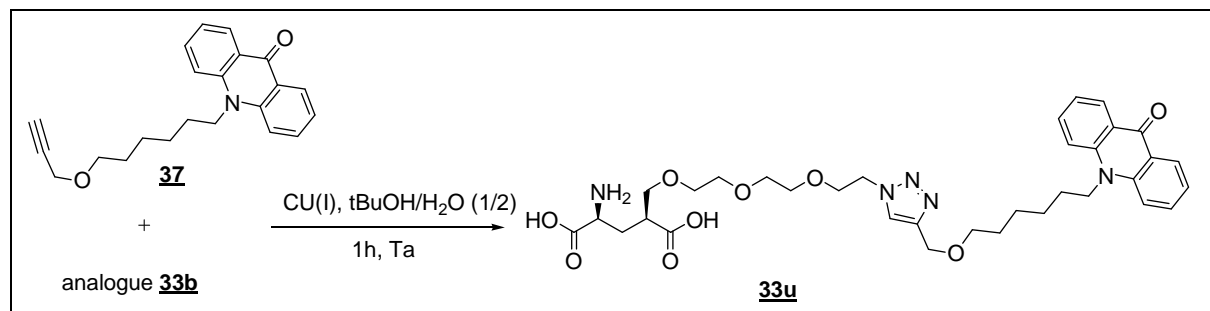


Schéma 141 : synthèse de l'analogue **33u**.

¹⁹⁹ N. Bahr, E. Tierney, J-L. Reymond, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 1489-1492.

Cependant, en raison de son caractère hydrophobe, le dérivé **33u** est adsorbé de façon très forte sur les résines échangeuses d'ions du type DOWEX, celles-ci étant constituées à base de polystyrène. En conséquence, nous avons été amenés à utiliser du MeOH pour éluier le composé **33u**. Nous avons alors isolé un composé avec un rendement massique de 82 %. Bien que les spectres RMN du produit isolé soient compatibles avec la structure de **33u**, ce dernier ne présentait plus la révélation spécifique à la ninhydrine caractéristique des composés aminés. De plus l'analyse par spectrométrie de masse a montré que le produit isolé dans ces conditions a subi une réaction de déshydratation, probablement par formation du dérivé pyroglutamique (Schéma 142).

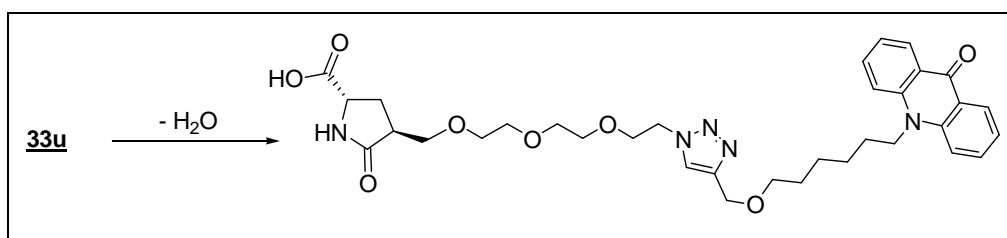


Schéma 142 : cyclisation du composé **33u** lors de la purification sur résine acide.

Le changement de méthode de purification pour ce type d'analogue du Glu est donc indispensable. La purification par HPLC en phase inverse (phase : Si C_{18} par exemple) semble le moyen le plus adapté, surtout que ce composé est facilement détectable par UV. Cependant, par manque de temps, nous n'avons pas pu poursuivre cette étude.

IV.4 Préparation de biligands ...

Nous avons entrepris au cours des derniers mois de cette thèse, d'initier une étude présentée dans la partie projet et concernant la préparation de biligands pour les récepteurs du Glu. Il s'agit donc d'un travail préliminaire et les analyses des nouveaux analogues obtenus et décrits dans les paragraphes suivants, sont parfois incomplètes.

IV.4.1 Synthèse du diglutamate **33v**

Nous nous sommes fixés pour premier objectif la préparation de la molécule symétrique **33v** présentant deux motifs Glu séparés par un bras espaceur modulable. Dans un premier temps, nous avons synthétisé le dialcyne **38**²⁰⁰ isolé avec un rendement de 70 % après réaction entre le triéthylèneglycol et le bromure de propargyle (Schéma 143).

²⁰⁰M. McPhee, M. S. Sean, *Biorg. Med. Chem.*, **2001**, 2809-2818.

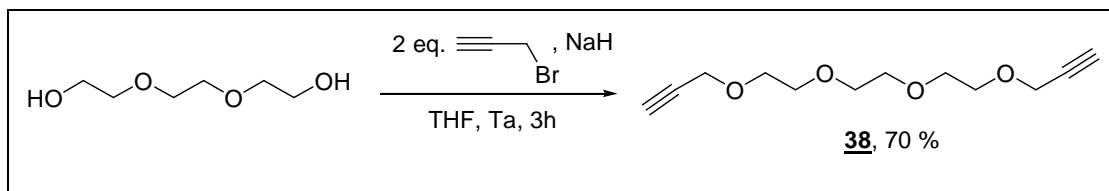


Schéma 143 : synthèse du dialcyne 38.

Au cours d'un premier essai, le composé **33v** a été obtenu par cycloaddition avec un rendement de 31 % (Schéma 144).

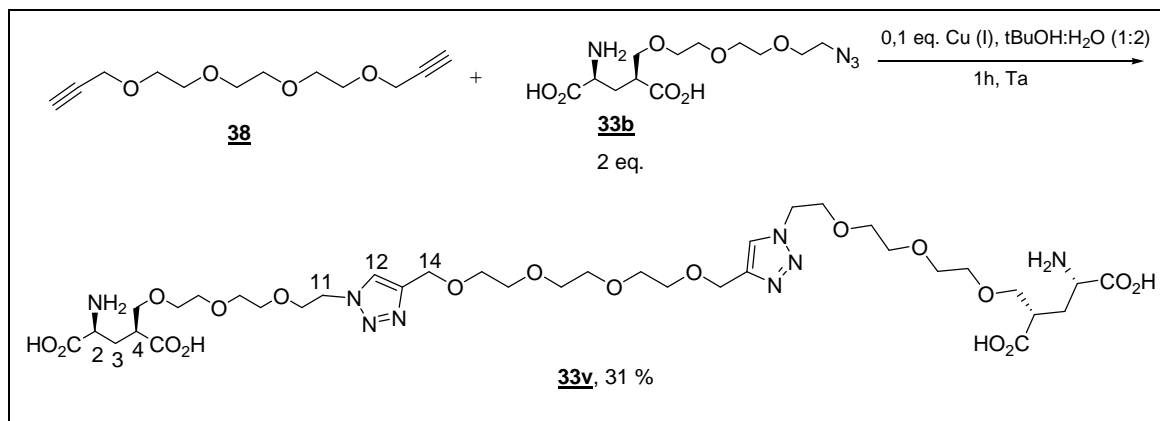


Schéma 144 : synthèse du bi-ligand **33v**.

Les analyses RMN ^1H et ^{13}C valident la structure du di-glutamate : on observe bien la disparition du signal correspondant au méthylène en α du N_3 de l'acide aminé de départ (qui est à 3,5 ppm en RMN ^1H et 42 ppm en RMN C^{13}). De même, le spectre ne semble plus comporter de signal correspondant au proton alcétylénique du réactif de départ (vers 2 ppm). L'apparition d'un triplet plus déblindé à 4,5 ppm correspondant aux H^{11} en α du cycle triazole et la présence d'un singulet à 8 ppm correspondant à H^{12} prouvent que la cycloaddition a bien eu lieu. De même, le signal du méthylène H^{14} initialement en α de l'alcyne avec un déplacement chimique de 4,1 ppm, est déblindé à 4,6 ppm. De plus, les pics à 125 ppm (C^{12}) et 144 ppm (C^{13}) caractéristiques du cycle triazole sont bien présents sur le spectre ^{13}C . L'intégration des pics en RMN ^1H semble compatible avec la structure du di-glutamate **33v** à l'exception de l'intégration du signal correspondant au H^{12} vers 8 ppm qui n'intègre que pour 1,4 au lieu de 2 (Figure 46). Une analyse par spectroscopie de masse haute résolution a été réalisée et nous a permis de conclure que la structure proposée pour le composé **33v** est bien exacte.

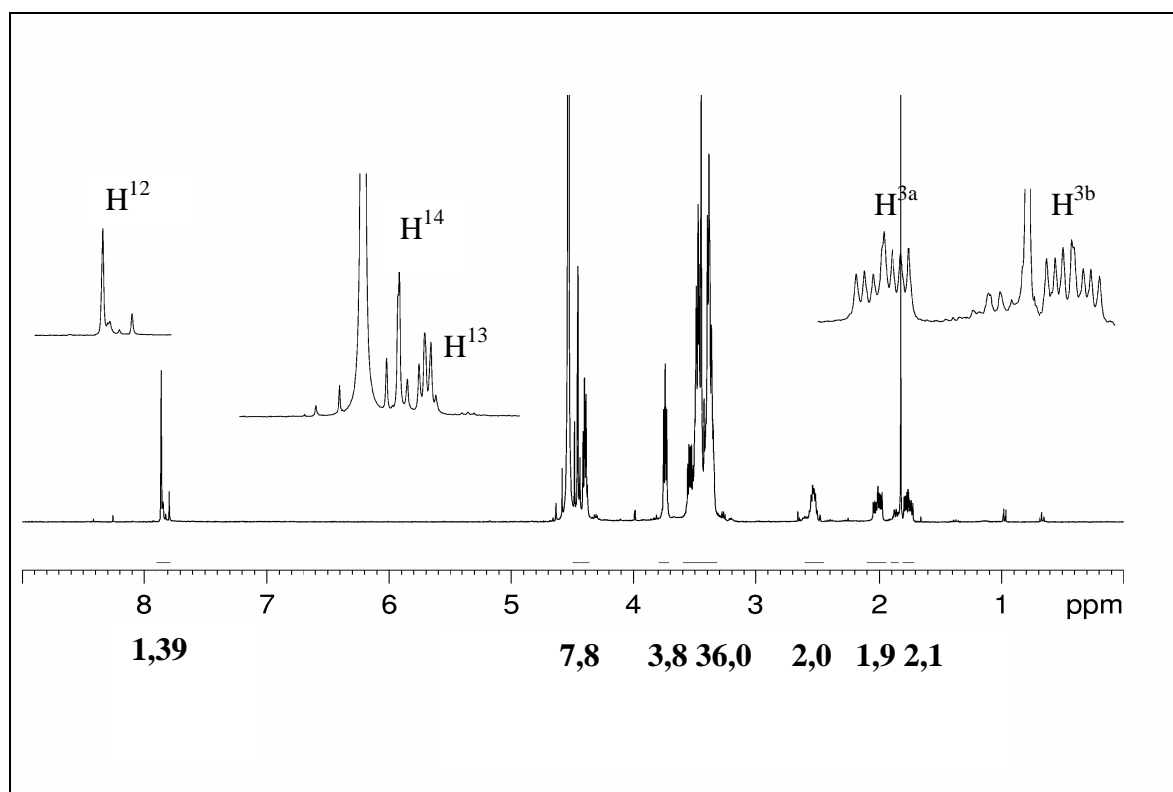


Figure 46 : spectre RMN ^1H du composé **33v** dans D_2O .

IV.4.2 Vers des analogues disymétriques ...

Nous avons également envisagé de mettre au point une méthode pour la synthèse de bi-ligands non symétriques. O.D. Montagnat et al.²⁰¹ ont montré que la protection par un groupement triméthylsilyl permettrait d'effectuer une cycloaddition sélective sur un dialcynes : seul l'alcyne non protégé réagit avec l'azoture pour former un cycle triazole.

Des premiers essais ont été réalisés pour la mono-protection du composé **38** par un TMS. Deux méthodes sont décrites dans la littérature pour des exemples similaires : monoprotection du (1,7)-octadiyne, Rd = 50 %²⁰² et du (1,7)-4-oxo-octadiyne, Rd = 97 %²⁰³. Ces méthodes ont été appliquées au dialcynes **38** (Schéma 145).

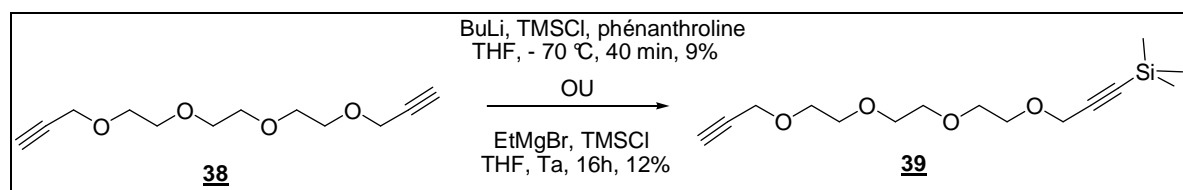


Schéma 145 : essais de mono-protection du composé dialcynes **38**.

²⁰¹ O. D. Montagnat et al. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 6971-6974.

²⁰² Y. Makiokazu, Y. Taniguchi, T. Kitamura, Y. Fujiwara, A. Saiki, K. Takaki, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1997**, 134, 349-355.

²⁰³ G. B. Jones et al., *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 5727-5732.

Dans le premier cas, le bromure d'éthylmagnésium a été utilisé comme base pour former un alcynyl-magnésien. L'addition en quantité stœchiométrique de TMSCl sur cet intermédiaire conduit au produit mono-syllilé avec seulement 12 % de rendement. Un second essai a été effectué en présence de BuLi dans le THF à -70°C . Dans ce cas, le composé **39** n'est produit qu'avec un rendement de 9 %.

Bien que ces rendements soient très faibles et que ces réactions nécessitent une optimisation poussée, nous avons cependant pu effectuer quelques tests de cycloaddition sur le composé que nous avons synthétisé (Schéma 146).

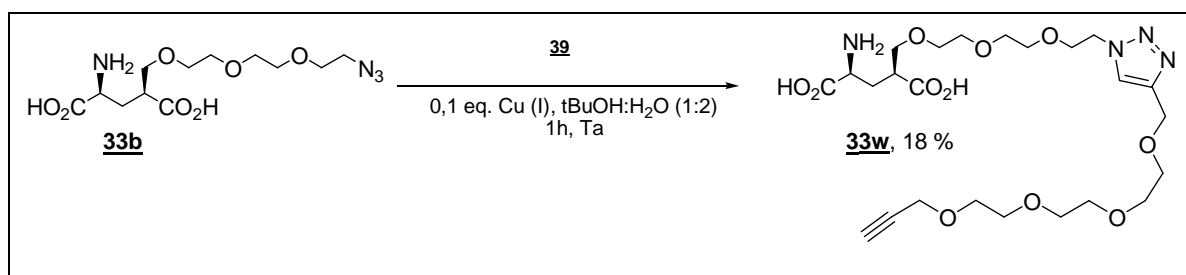


Schéma 146 : cycloaddition entre l'azoture **33b** et le dialcyne monoprotégé **39**.

L'analyse par RMN du milieu réactionnel avant purification est très difficile. En effet la présence de cuivre conduit à une mauvaise résolution du spectre RMN¹H. Après purification, nous avons finalement isolé le produit desilylé **33w** avec un rendement de 18%. Il est très probable que la déprotection de l'alcyne ait eu lieu en milieu acide, au cours de l'évaporation du solvant (AcOH 0,2M) à l'issue de la chromatographie.

En parallèle, nous avons expérimenté une autre approche impliquant l'alcyne **40**. Ce composé a été synthétisé à partir du triéthylèneglycol mono chloré, commercial (Schéma 147). Le faible rendement de cette réaction est sans doute lié à une auto-condensation du chloro-alcool.

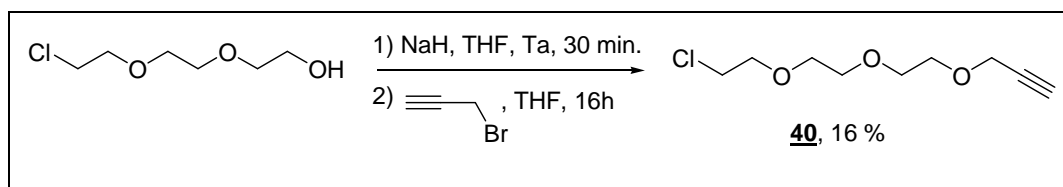


Schéma 147 : synthèse de l'alcyne **40**.

Après formation du cycle triazole à partir des composés **33b** et **40**, le chlore en bout de chaîne du nouvel analogue **33x**, a subi une substitution en présence de NaN₃ qui, dans des conditions douces, forme l'analogue du Glu **33y** avec un rendement de 75 % (schéma 148). Ce composé est ainsi prêt pour une nouvelle réaction avec divers alcynes offrant ainsi l'accès à une librairie de bi-ligands (Schéma 148).

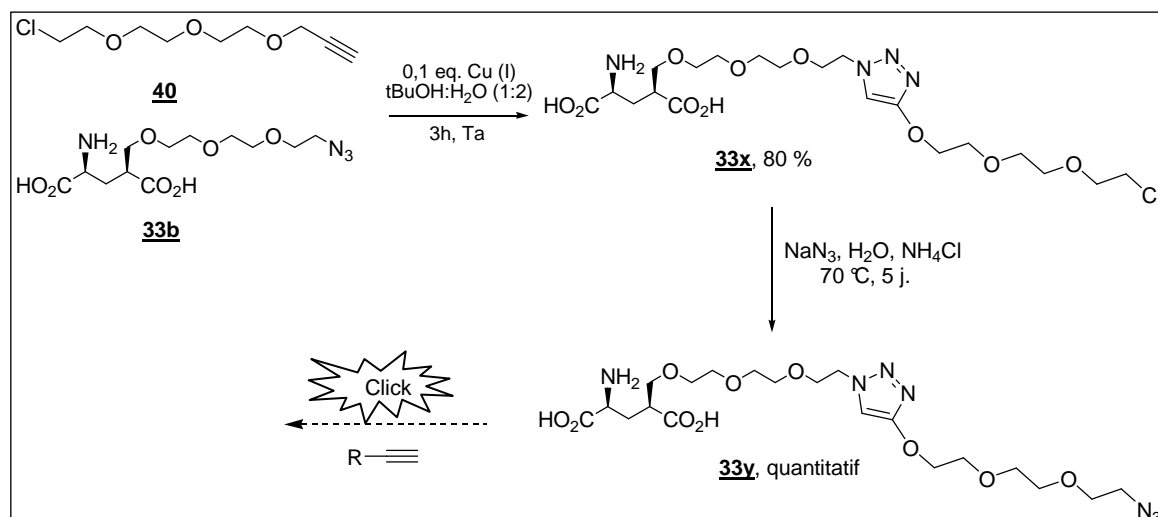


Schéma 148 : méthode proposée pour la synthèse de bi-ligands.

Ainsi, même si la synthèse du dérivé **40** reste à optimiser, cette dernière approche semble très intéressante. Elle pourrait en effet permettre d'associer l'analogue **33b** (ou l'analogue **33c**) à une variété de ligands présentant une fonction alcyne, tout en modulant la longueur du bras espaceur. Cette approche devrait être privilégiée dans la suite de cette étude.

Chapitre V Evaluation biologique des analogues du Glu

Les analogues du Glu synthétisés au laboratoire ont fait l'objet de tests pharmacologiques sur les transporteurs et récepteurs du Glu du système glutamatergique. Ces études ont pu être effectuées grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr. L. Bunch et du Dr. A. A. Jensen de l'université des sciences pharmaceutiques de Copenhague.

Ce chapitre présente tout d'abord le principe et les résultats des tests pharmacologiques mis en oeuvre au Danemark pour l'étude pharmacologique des EAATs puis des iGluRs. Nous exposerons les résultats obtenus avec les analogues du Glu alkylés et fonctionnalisés en position 4. Ces tests ont été effectués à la fin de cette thèse et il manque certains résultats qui n'ont pas pu être obtenus au cours de la rédaction, en particulier les résultats relatifs aux mGluRs.

V.1 Tests biologiques sur les EAATs

Comme nous l'avons expliqué dans la partie bibliographique, les EAATs jouent un rôle primordiale pour maintenir la concentration en L-Glu dans la fente synaptique inférieure à la limite cytotoxique pour les neurones. Nos collaborateurs ont utilisé deux tests pharmacologiques permettant d'évaluer l'activité inhibitrice des analogues du Glu sur les EAAT1-3²⁰⁴. La caractérisation des propriétés pharmacologiques des EAAT1-3 exprimés dans des cellules de type HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) a été réalisée par un dosage basé sur la recapture du radioligand [H^3]-D-Asp ou par un test qui met en jeu la sonde fluorescente anionique et lipophile, le bis-oxonol (FMP : FLIPR® Membrane Potential)²⁰⁴.

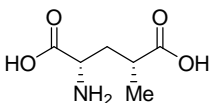
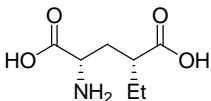
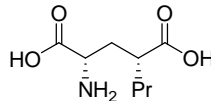
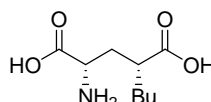
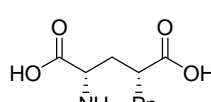
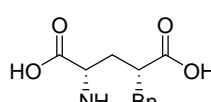
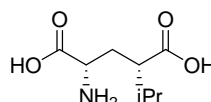
Dans le cas de l'utilisation du radioligand [H^3]-D-Asp, la radioactivité des cellules HEK293 diminue lorsqu'il y a inhibition des EAATs. En effet, l'inhibiteur entre en compétition avec le radioligand qui est un inhibiteur substrat des EAATs et empêche son transport, d'où une diminution de la radioactivité globale de la cellule.

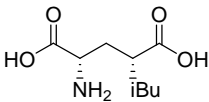
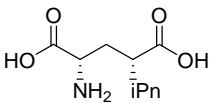
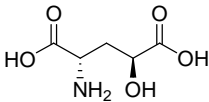
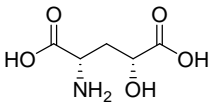
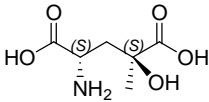
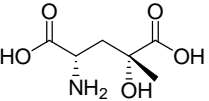
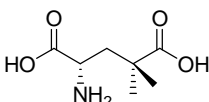
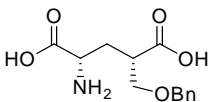
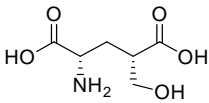
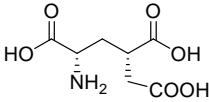
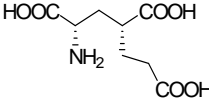
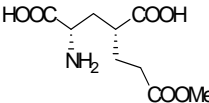
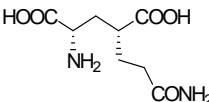
Dans le test FMP, la dépolarisation de la membrane des EAATs entraîne l'entrée de la sonde fluorescente à l'intérieur de la cellule, ce qui entraîne une augmentation de sa fluorescence à 530 nm, suite à des interactions avec des protéines membranaires. L'inhibition des EAATs modifie le caractère ionique et se traduit par une hyperpolarisation de la membrane qui provoque la sortie de la sonde. On observe alors une diminution de la fluorescence de la cellule. Dans le cas du test FMP, il est possible de différencier les inhibiteurs non substrats des substrats. En effet, un substrat utilisé seul produit une

²⁰⁴ A. A. Jensen, H. Bräuner-Osborne, *Biochem. Pharmacol.*, 2004, 67, 2115-2127.

augmentation de la fluorescence tandis qu'un inhibiteur non substrat (c'est-à-dire qui bloque le transporteur sans être transporté) permet uniquement d'observer une inhibition de l'augmentation de la fluorescence induite par le substrat naturel, le Glu.

Le tableau suivant présente les IC_{50} (en italique) pour les analogues du Glu inhibiteurs non substrat et les K_m (en gras) pour les dérivés qui sont (inhibiteurs) substrats (en gras) mesurés dans le test FMP. Ces tests ont aussi concernés les analogues alkylés préparés précédemment au laboratoire, et qui ont fait l'objet d'une publication en 2005 (cf. partie bibliographique).

Structure	EAAT		
	En <i>italique</i> : IC_{50} (μM)		
	En normal : K_m (μM)		
	EAAT1	EAAT2	EAAT3
Glu	7,9	21	9,9
	13	13	6.6
	23	14	38
	13	22	32
	50	42	80
	120	77	98
	13	36	66
	35	19	51

		55	22	300
		29	26	80
		140	67	81
		1000	1000	1000
		88	48	130
		>3000	>3000	>3000
		>3000	>3000	>3000
<u>33a</u>		~1000	~300	>3000
<u>33i</u>		~3000	~300	~3000
<u>33d</u>		>3000	~3000	>3000
<u>33s</u>		~3000	~3000	~3000
<u>33g</u>		~1000	~300	>1000
<u>33m</u>		~3000	~1000	>3000

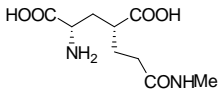
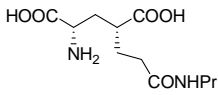
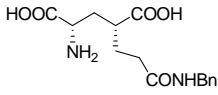
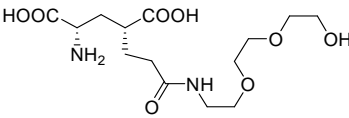
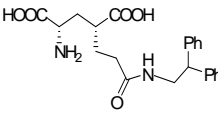
<u>33n</u>		>1000	~1000	>1000
<u>33o</u>		>3000	~3000	~3000
<u>33p</u>		~1000	~300	~1000
<u>33r</u>		>1000	>1000	>1000
<u>33q</u>		~1000	75	~1000

Tableau 29 : caractérisation de l'interaction entre les transporteurs du Glu EAAT1-3 et les nanalogues du Glu monosubstitués en position 4 dans le test FMP.

En accord avec les données de la littérature, le 4*R*-Me-KG est bien un inhibiteur non substrat des EAAT2 et 3 et substrat des EAAT1. Les analogues alkylés du Glu présentant des chaînes plus ou moins longues (Et à iPr), sont tous des inhibiteurs non substrats des EAATs et ne présentent pas de sélectivité marquée.

Tous les analogues fonctionnalisés que nous avons préparé, sont également des inhibiteurs non substrats à l'exception des 4-Hydroxy-Glu qui sont des substrats et en particulier le dérivé (2,4)-*anti* qui présente une affinité plus importante que son isomère (2,4)-*syn*. Les dérivés 4-hydroxy-4-méthyl-Glu sont, quant à eux, des inhibiteurs non substrats des EAATs avec là encore une affinité plus grande pour l'isomère (2,4)-*anti*. Ces dérivés hydroxylés, qu'ils soient inhibiteurs substrats ou inhibiteurs non substrats, ne présentent aucune sélectivité marquée.

Les analogues que nous avons préparé et présentant des fonctions alcool, éther, acide carboxylique, ester ou amide sont également des inhibiteurs non substrats de faibles sélectivités vis-à-vis des EAATs. Seul le dérivé amidique **33q** comportant un groupement diphenylethyl est un inhibiteur non substrat présentant une bonne sélectivité en faveur des EAAT2.

Les tests d'utilisation de la recapture du radioligand [H^3]-D-Asp ont également été mis en œuvre pour les analogues fonctionnalisés. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.


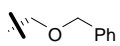
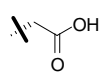
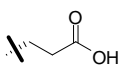
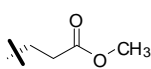
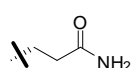
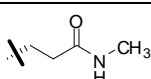
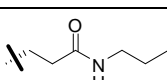
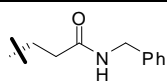
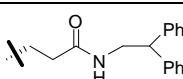
	R	EAAT1	EAAT2	EAAT3
Glu	H	35 [4.5 ± 0.04]	62 [4.2 ± 0.03]	51 [4.3 ± 0.02]
33i		~3000 [~2.5]	140 [3.9 ± 0.05]	~3000 [~2.5]
33a		450 [3.3 ± 0.05]*	290 [3.5 ± 0.03]	1000-3000 [2.5-3]
33d		>3000 [<2.5]	>3000 [<2.5]	>3000 [<2.5]
33s		>3000 [<2.5]	>3000 [<2.5]	>3000 [<2.5]
33g		1000-3000 [2.5-3]	180 [3.8 ± 0.04]	~3000 [~2.5]
33m		>3000 [<2.5]	290 [3.5 ± 0.04]	>3000 [<2.5]
33n		>3000 [<2.5]	680 [3.2 ± 0.05]	>3000 [<2.5]
33o		>3000 [<2.5]	1000-3000 [2.5-3]	>3000 [<2.5]
33p		~1000 [~3]	410 [3.4 ± 0.05]	~3000 [~2.5]
33q		1000-3000 [2.5-3]	95 [4.0 ± 0.04]	~3000 [~2.5]

Tableau 30 : test de la recapture du radioligand [H³]-D-Asp effectué dans des cellules EAAR1-3-HEK 293 : Ki en μM , $pK_i \pm \text{S.E.M}$ entre crochets et **Km** pour le Glu en gras.

Les résultats obtenus sont cohérents avec les ceux du test FMP. En particulier, l'amide 33q apparaît ici encore comme la molécule la plus intéressante en terme d'affinité et de sélectivité.

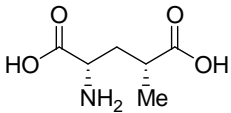
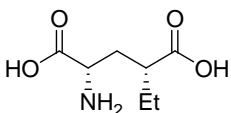
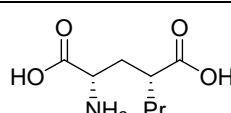
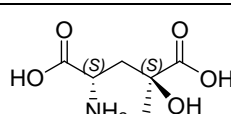
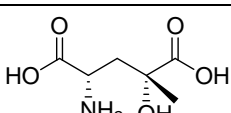
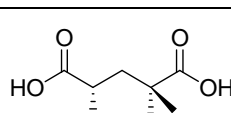
V.2 Tests pharmacologiques sur les iGluRs

Les analogues du Glu synthétisés au laboratoire ont été également testés vis-à-vis des iGluRs et sur les différents types de sous-unités des récepteurs kaïnate (KARs), iGluR5-7. Les essais pharmacologiques ont été réalisées à partir de préparation de membranes de cerveau de rats en utilisant le radioligand [H³]AMPA pour les AMPARs, [H³]CGP 39653 (acide D-L-

(*E*)-2-amino-4-propyl-5-phosphono-pent-3-énoïque) pour les NMDARs et le [H^3]KA pour les KARs qui rentrent en compétition avec les ligands des récepteurs ioniques²⁰⁵.

Les récepteurs recombinants iGluR5-7 humains ont été exprimés dans des cellules d'insectes *Sf9* par infection baculovirale. L'affinité des analogues du Glu sur les différentes sous-unités des KRs a été réalisée suivant un dosage de radioligands présents dans les cellules. Ainsi, [H^3]-(*2S,4R*)-Me-Glu a été utilisé pour étudier les dosages portant sur les iGluR5, [H^3]-KA pour les mesures d'affinité sur les iGluR6²⁰⁶. Les tests concernant les iGLUR7 ne sont pas publiés à ce jour et ces données restent donc confidentielles.

Le tableau suivant présente les valeurs des IC₅₀ mesurées dans les différents tests pour nos analogues fonctionnalisés. Des résultats relatifs à des molécules préparées précédemment ont été inclus pour comparaison.

Structure	iGluR IC ₅₀ (μM)			Sous unités des KAIN		
	AMPA	KAIN	NMDA	iGluR5	iGluR6	iGluR7
	4.8	0.017	10	Nd	nd	nd
	16	0.12	38	nd	nd	Nd
	78	0.7	>100	nd	nd	nd
	24	0.75	>100	<1	~1	~1
	>a100	16	>100	~10	~100	~10
	>100	7.4	>100	~5	~5	~5

²⁰⁵ M. B. Hermit, J. R. Greenwood, B. Nielsen, L. Bunch, C. G. Jorgensen, H. T. Vestergaard, T. B. Stensbol, C. Sanchez, P. Krogsgaard-Larsen, U. Madsen, H. Bräuner-Osborne, *European Journal of Pharmacology*, **2004**, *486*, 241-250.

²⁰⁶ U. Madsen, D. S. Pickering, B. Nielsen, H. Bräuner-Osborne, *Neuropharmacology*, **2005**, *49*, 114-119.

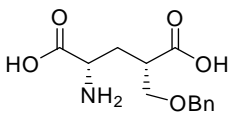
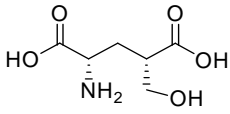
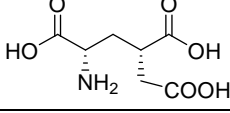
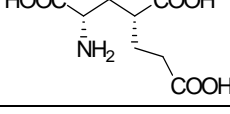
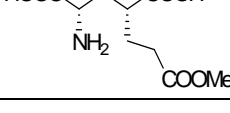
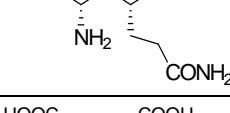
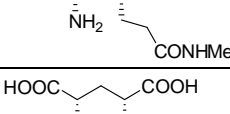
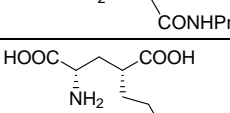
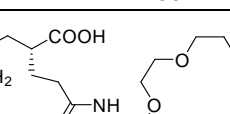
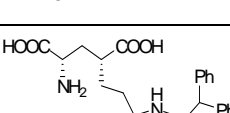
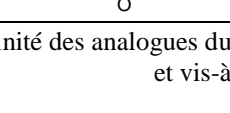
<u>33a</u>		>100	nd	26	~1	~10	~10
<u>33i</u>		44	0.24	15	<1	nd	nd
<u>33d</u>		>100	39	>100	~5	~5	~10
<u>33s</u>		>100	>100	52	~10	>100	~50
<u>33g</u>		31	nd	>100	0.043	~10	~1
<u>33m</u>		25	16	>100	<<1	~20	~10
<u>33n</u>		32	nd	>100	<<1	0,123	0,054
<u>33o</u>		74	nd	>100	~3	~10	~10
<u>33p</u>		>100	>100	72	~1	~100	~100
<u>33r</u>		nd	nd	nd	~100	~100	~100
<u>33q</u>		>100	>100	>100	37	>100	>100

Tableau 31 : Affinité des analogues du Glu pour les iGluRs AMPA, KAIN et NMDA des synaptosomes de rat et vis-à-vis des sous-unités iGluR5-7 humains.

Dans la série des 4-alkyl-Glu, les 4-Me, Et et Pr-Glu sont des ligands des iGluRs avec une sélectivité marquée pour les récepteurs KARs. Comme cela est décrit dans la littérature, le (2*S*,4*S*)-4-Me-Glu présente la sélectivité et 'affinité la plus marquée pour les KARs avec une IC₅₀ de 0,017 μ M, 100 fois moins importante que celles mesurées dans le cas des NMDARs et des AMPARs. Nous observons la même tendance pour les dérivés disubstitués

qui offre une sélectivité pour les KARs par rapport aux autres iGluRs avec cependant des affinités plus faibles.

Le composé **33a** est aussi un ligand des iGluRs avec une légère sélectivité pour les KARs et plus particulièrement pour les sous-unités iGluR5. Dans le cas des dérivés **33i** et **33d**, nous observons aussi un IC₅₀ mesuré vis à vis des KARs plus faibles que dans le cas des AMPARs et des NMDARs. La tendance s'inverse pour le composé **33s**. En effet, le composé **33s** est sélectif des NMDARs contrairement à son analogue estérifié **33g** qui présente quant à lui une affinité très marquée pour les récepteurs KAIN et plus particulièrement pour les iGluR5 (IC₅₀ = 0,043 µM). Les dérivés amidiques **33m-n** présente la même préférence pour les iGluR5. Les dérivés amidiques **33n-o** restent des ligands des iGluRs avec encore une sélectivité plus marquée pour les KARs. Par contre, le composé **33p** ne présente pas de sélectivité vis-à-vis des iGluRs mais reste un ligand sélectif des iGluR5 par rapport aux iGluR6-7. Le dérivé **33r** n'a été testé que sur les KARs et ne présente pas d'activité intéressante vis-à-vis des sous-unités des KARs.

L'analogue **33q** possède une faible affinité pour les 3 groupes des iGluRs (K_i > 100 µM). Ce qui est un atout puisqu'il est aussi très sélectif des EAAT2. Le DHK (dihydrokainate) est aussi inhibiteur spécifique des EAAT2 mais il présente une affinité modérée pour le sous-groupe KAIN des iGLURs (IC₅₀ = 6 µM²⁰⁷) et pour les NMDARs (IC₅₀ = 350 µM²⁰⁸). Le composé **33q** offre donc une meilleure sélectivité vis-à-vis des EAAT2 par rapport aux iGluRs.

V.3 Conclusion

D'après les résultats exposés ci-dessus, le composé amidique **33q** constitue un bon inhibiteur très sélectif des EAAT2. Cette caractéristique permettra dans un futur très proche de mieux comprendre et déterminer le rôle des EAATs du type 2 par rapport aux autres transporteurs et récepteurs du Glu.

Les résultats obtenus avec les composés **33g** et **33m** sont également très intéressants. En effet, leur forte affinité sélective des iGluR5 fait de ces composés des outils potentiels pour l'étude pharmacologique des iGluR5. Ces composés feront prochainement l'objet d'une évaluation d'activité vis-à-vis des mGluRs.

²⁰⁷ K. Shimamoto, B. Lebrun, Y. Yasuda-kamatani, M. Sakaitani, Y. Shigeri, N. Yumoto, T. Nakajima, *Mol. Pharmacol.*, **2004**, 67, 2115-2127.

²⁰⁸ K. Shimamoto, B. Lebrun, Y. Yasuda-Kamatani, M. Sakaitani, Y. Schigeri, N. Yamoto, T. Nakajima, *Mol. Pharmacol.*, **1998**, 53, 195-201.

Chapitre VI Conclusion générale et perspectives

Durant ce travail de thèse, une douzaine de nouveaux analogues du Glu fonctionnalisés par des esters, acides, amides et éthers en position 4, ont été synthétisés par transamination des analogues du KG correspondants en utilisant l'AspAT d'*E.coli*. (Schéma 149). Nous avons démontré que cette enzyme est un catalyseur très efficace pour la transamination d'analogues du KG présentant des chaînes fonctionnalisées plus ou moins longues.

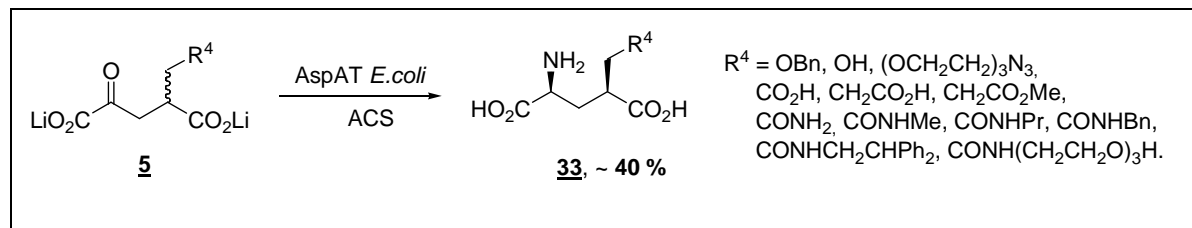


Schéma 149 : synthèse de nouveaux analogues du Glu fonctionnalisés.

Par ailleurs, la transamination de ces composés **5** catalysée par la BCAT pourrait permettre dans plusieurs cas d'accéder aux isomères L-2,4-*anti* comme cela a été décrit pour les analogues 3-Me- et 4-Me-KG¹³⁵.

Une importante partie de notre travail a porté sur la mise au point de méthodes simples et générales pour la synthèse d'analogues du KG fonctionnalisés. Ainsi, la méthode basée sur la condensation de Michael est très efficace pour la préparation de composés de type **5** obtenus avec des rendements globaux compris entre 20 et 48 %. Nous avons aussi mis au point une méthode générale basée sur la coupure oxydante d'énamines cycliques qui a permis de préparer une variété d'analogues du KG fonctionnalisés par diverses amides en position 4 (Schéma 150). Cette méthode a l'avantage de ne comporter que trois étapes (à partir de la cyclohexanone-2,5-dicarboxylate) et pourrait également être étendue à la synthèse de dérivés estérifiés en effectuant une coupure oxydante d'éthers ou d'esters d'énol cycliques.

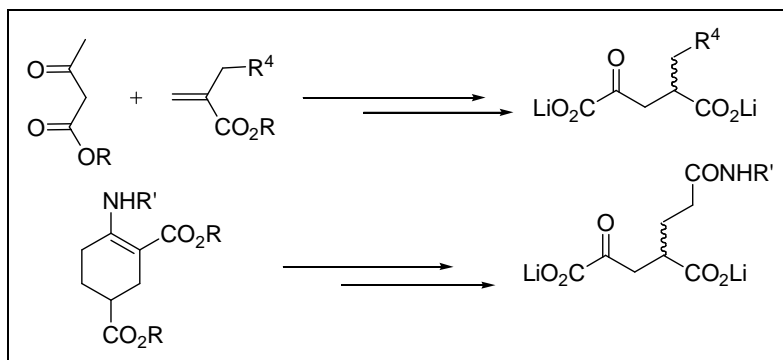


Schéma 150 : deux méthodes générales développées pour la synthèse d'analogues du KG fonctionnalisés.

Par ailleurs, plusieurs analogues du Glu présentant de longues chaînes polyéther ont été préparés à partir d'un seul et même analogue du Glu **33b** (schéma 151). En effet, ce composé présente un groupement azoture terminal qui nous a permis d'effectuer une cycloaddition [3+2] en réagissant avec divers alcynes. Les premiers essais ont permis de montrer que l'AspAT est active vis-à-vis de ces analogues dont la chaîne en position 4 est probablement assez longue pour sortir du site actif de l'enzyme. Ces résultats permettent d'envisager la synthèse d'analogues immobilisés qui pourraient être des substrats de l'enzyme. Ce type de composés peut permettre d'améliorer le procédé biocatalytique en utilisant un réacteur membranaire pour la préparation stéréosélective d'acides aminés non naturels à grande échelle.

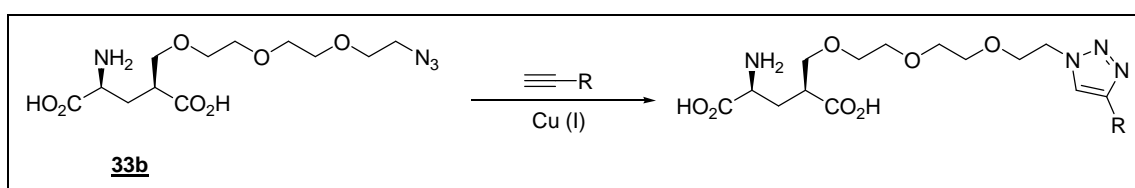


Schéma 151 : synthèse de nouveaux analogues du Glu à partir du composé **33b**.

Tous les analogues du Glu synthétisés au cours de cette thèse ont fait l'objet de tests pharmacologiques pour l'étude des EAATs et des iGluRs. Bien que les résultats des tests relatifs aux iGluRs ne soient pas complets à l'heure actuelle, le dérivé amidique **33g** constitue un bon substrat inhibiteur très sélectif des EAATs du type 2. Il pourrait donc être très utile pour mieux comprendre le rôle des EAAT2 dans le SNC.

D'autre part, les cycloadditions entre le composé azoté **33b** et divers alcynes permettront de préparer une variété de bi-ligands. Aujourd'hui cette approche constitue une perspective très intéressante pour la synthèse de composés présentant des activités plus sélectives et mieux contrôlées vis-à-vis des GluRs en interagissant de façon concertée sur les différents sites de liaisons de ligands compétitifs ou non compétitifs du Glu présents sur ces récepteurs (Schéma 152).

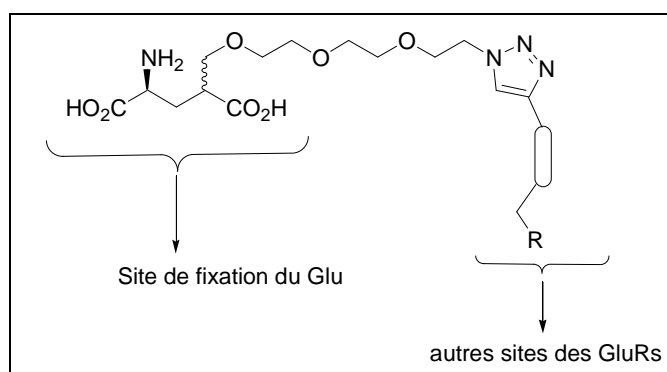


Schéma 152 : préparation de bi-ligands substrats des GluRs.

PARTIE II

ETUDE DE MODELISATION MOLECULAIRE DE L'AspAT

Projet de recherche

En parallèle des travaux de synthèse présentés dans la partie I, une étude de modélisation moléculaire portant sur le site actif de l'AspAT d'*E.coli* a été effectuée sous la tutelle du Dr. Bettina ABOAB. Ce travail avait pour objectif de comprendre et de mieux expliquer la spécificité de substrat de l'AspAT que nous avons pu appréhender expérimentalement grâce aux études cinétiques effectuées avec les analogues du KG. En modélisant des complexes enzyme-ligands par une approche de Docking, nous avons cherché à expliquer l'énantiosélectivité marquée de l'enzyme en faveur d'un des énantiomères des analogues du KG. Nous avons aussi cherché à comprendre la particularité de l'AspAT de s'accommoder de groupements volumineux et/ou très longs en position 4. Cette étude a eu également pour objectif de définir un modèle de prédiction d'activité de l'AspAT susceptible d'orienter les travaux de synthèse vers des substrats potentiels de l'enzyme.

Avant de présenter et de discuter les résultats obtenus lors de cette étude, une introduction est dédiée à la présentation des différentes techniques de modélisation moléculaire. De plus, afin de mieux interpréter les résultats de modélisation, il nous a paru indispensable de décrire l'AspAT en insistant sur son mécanisme d'action et la structure du site actif, essentielle à l'activité de l'enzyme.

Etude Bibliographique

Chapitre I Introduction à la modélisation moléculaire

I.1 Introduction et domaines d'application

La modélisation moléculaire regroupe l'ensemble des méthodes théoriques qui permettent de simuler par ordinateur le comportement des molécules en phase gaz, en solution ou lors d'une réaction chimique. Les techniques de modélisation moléculaire se sont développées en même temps que l'outil informatique. Parmi les domaines d'application des techniques de modélisation moléculaire, on peut citer l'analyse conformationnelle de molécules en phase gaz ou liquide, la réactivité chimique, l'aide à la conception de molécules à visées thérapeutiques, la prédiction de la structure 3D de protéines par homologie, ou encore les études de complexes protéine-ligand dites de « Docking ».

A l'heure actuelle, les techniques de modélisation moléculaire ont acquis une grande fiabilité notamment en ce qui concerne les études de Docking. C'est la raison pour laquelle, tous les laboratoires de recherche se sont dotés de tels outils.

I.2 Les méthodes de calcul de l'énergie d'une molécule

En ce qui concerne le calcul d'énergie d'une structure chimique, le modélisateur dispose d'un éventail de techniques qui ont été développées selon deux grands types de méthodes:

- Les méthodes de Mécanique Quantique (MQ) basées sur la résolution de l'équation de Schrödinger (équation différentielle fonction des coordonnées électroniques du système étudié).
- Les méthodes de Mécanique Moléculaire (MM) basées sur la mécanique classique qui permet de calculer l'énergie stérique du système au niveau des atomes et non plus des électrons.

La taille du système moléculaire à étudier et la puissance de l'ordinateur sont les critères à considérer pour déterminer le choix de la méthode de calcul d'énergie.

Dans le cas de molécule de taille moyenne (< 200 atomes), les méthodes de mécanique quantique sont généralement appliquées, alors que dans le cas de macromolécules, des méthodes de mécanique moléculaire sont utilisées.

I.2.1 Les méthodes de mécanique quantique

Les méthodes de mécanique quantique qui comprennent les méthodes *ab initio*, les méthodes de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) et les méthodes semi-empiriques, sont basées sur la résolution de l'équation de Schrödinger du système moléculaire étudié dont l'expression est la suivante :

Équation 5 :
$$\mathbf{H} \Phi = E \Phi$$

où \mathbf{H} : est l'opérateur Hamiltonien, $\mathbf{H} = \mathbf{T} + \mathbf{V}$.

avec \mathbf{T} : opérateur énergie cinétique des électrons et des noyaux.

\mathbf{V} : opérateur énergie potentielle des interactions électrons-noyaux, noyaux-noyaux et électrons-électrons.

E : Energie moléculaire totale.

Φ : fonction d'onde du système.

Les méthodes *ab initio* sont les méthodes les plus précises. Elles calculent l'énergie du système à partir des orbitales moléculaires.

Les méthodes de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) calculent l'énergie du système à partir de la densité électronique et non plus des orbitales moléculaires.

Les méthodes semi-empiriques permettent d'effectuer des calculs d'énergie sur des molécules de plus grande taille que les méthodes *ab initio*, car les orbitales moléculaires sont exprimées seulement sur la base des orbitales atomiques des électrons de la couche de valence.

I.2.2 Les méthodes de mécanique moléculaire

Les méthodes de mécanique moléculaire ont été développées pour les molécules de grande taille (milliers d'atomes : protéines, ADN).

En mécanique moléculaire, les atomes sont assimilés à des sphères dures non élastiques et les liaisons à des ressorts de longueur b (Figure 47). Les mouvements des atomes sont régis par des forces intramoléculaires et intermoléculaires. Ces différentes forces proviennent de l'énergie potentielle des atomes due aux interactions entre atomes.

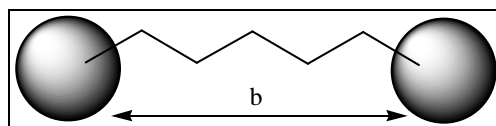


Figure 47: Modèle moléculaire des méthodes de mécanique moléculaire.

L'énergie potentielle est définie comme une somme de termes d'interactions intramoléculaires et intermoléculaires. Tous ces différents termes font appel à des paramètres empiriques ajustés sur l'expérience ou déterminés à partir de calculs *ab initio* d'où le terme de méthode empirique pour ce type de méthode.

Pour chaque conformation, l'expression de l'énergie totale E_{totale} d'une molécule est la suivante :

$$E_{\text{totale}} = E_{\text{stretching}} + E_{\text{bending}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{elec}} + E_{\text{hydro}}$$

Équation 6 : Energie potentielle d'une molécule.

Où $E_{\text{stretching}}$ est l'énergie d'étirement des liaisons interatomiques,
 E_{bending} est liée à la déformation des angles de liaisons,
 E_{torsion} est l'énergie de torsion des angles dièdres,
 E_{vdw} représente les énergies liées aux interactions de Van Der Waals entre atomes non liés,
 E_{elec} est l'énergie électrostatique coulombienne,
 E_{hydro} rend compte des liaisons hydrogènes non comprises dans E_{vdw} .

L'expression mathématique utilisée pour décrire les différentes énergies et les paramètres empiriques intervenants dans ces expressions constitue un **champ de force**.

Les principaux champs de force sont les suivants : MM2 et MM3 (Allinger, 1977²⁰⁹ et 1989²¹⁰), AMBER (Kollman²¹¹, 1981) dédié aux peptides et protéines, CHARMM (Karplus²¹², 1983) puis CVFF et CFF91 (Hagler^{213,214}, 1988-1994) pour les molécules biologiques et les macromolécules.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé le champ de forces CFF91²¹⁵ (Covalent ForceField 91) de la firme Accelrys. Sa forme analytique, détaillée dans l'Équation 7 et illustrée à la Figure 48, comprend les cinq contributions classiques décrites plus haut, ainsi que sept termes croisés. CFF91 est plus particulièrement adapté à l'étude de petites molécules organiques, mais permet également de traiter des macromolécules biologiques.

²⁰⁹ N. L. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 8127-8134.

²¹⁰ N. L. Allinger, Y. H. Yuh, J.-H. Lii, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8551-8565.

²¹¹ P. K. Weiner, P. A. Kollman, *J. Com. Chem.*, **1981**, 2, 287-303.

²¹² B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Com. Chem.*, **1983**, 187-217.

²¹³ A. T. Hager et al., *Proteins :Structure, Function and Genetics*, **1988**, 4, 31-47.

²¹⁴ A. T. Hager, C. S. Ewig, *Comp. Phys. Comm.*, **1994**, 84, 131-155.

²¹⁵ Maple, J.R.; Hwang, M.-J.; Stockfisch, T.P.; Dinur, U.; Waldman, M.; Ewig, C.S.; Hagler, A.T. *J. Comp. Chem.* **1994**, 15, 162-182.

$$\begin{aligned}
E = & \sum 2K_b (b - b_0)^2 + 3K_b (b - b_0)^3 + K_b (b - b_0)^4 \quad (1) \\
& + \sum 2K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + 3K_\theta (\theta - \theta_0)^3 + K_\theta (\theta - \theta_0)^4 \quad (2) \\
& + \sum_\phi K_\phi (1 - \cos\phi) + 2K_\phi (1 - 2\cos\phi) + 3K_\phi (1 - \cos3\phi) \quad (3) \\
& + \sum_\chi K_\chi X^2 \quad (4) \\
& + \sum_b \sum_{b'} K_{bb'} (b - b_0) (b' - b'_0) \quad (5) \\
& + \sum_\theta \sum_{\theta'} K_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0) (\theta' - \theta'_0) \quad (6) \\
& + \sum_b \sum_\theta K_{b\theta} (b - b_0) (\theta - \theta_0) \quad (7) \\
& + \sum_b \sum_\phi (b - b_0) [K_{\phi b} \cos\phi + 2K_{\phi b} \cos2\phi + 3K_{\phi b} \cos3\phi] \quad (8) \\
& + \sum_{b'} \sum_\phi (b' - b'_0) [K_{\phi b'} \cos\phi + 2K_{\phi b'} \cos2\phi + 3K_{\phi b'} \cos3\phi] \quad (9) \\
& + \sum_\theta \sum_{\theta'} (\theta - \theta_0) [K_{\phi\theta} \cos\phi + 2K_{\phi\theta} \cos2\phi + 3K_{\phi\theta} \cos3\phi] \quad (10) \\
& + \sum_\theta \sum_{\theta'} \sum_\phi K_{\phi\theta\theta'} (\theta - \theta_0) (\theta' - \theta'_0) \cos\phi \quad (11) \\
& + \sum_{i>j} (q_i \cdot q_j) / r_{ij} + \sum_{i>j} \epsilon_{ij} [2(r_{ij}^* / r_{ij}) - 3(r_{ij}^* / r_{6ij})] \quad (12)
\end{aligned}$$

Équation 7 : Expression mathématique de l'énergie totale d'une molécule en fonction des coordonnées des atomes (b, θ, ϕ).

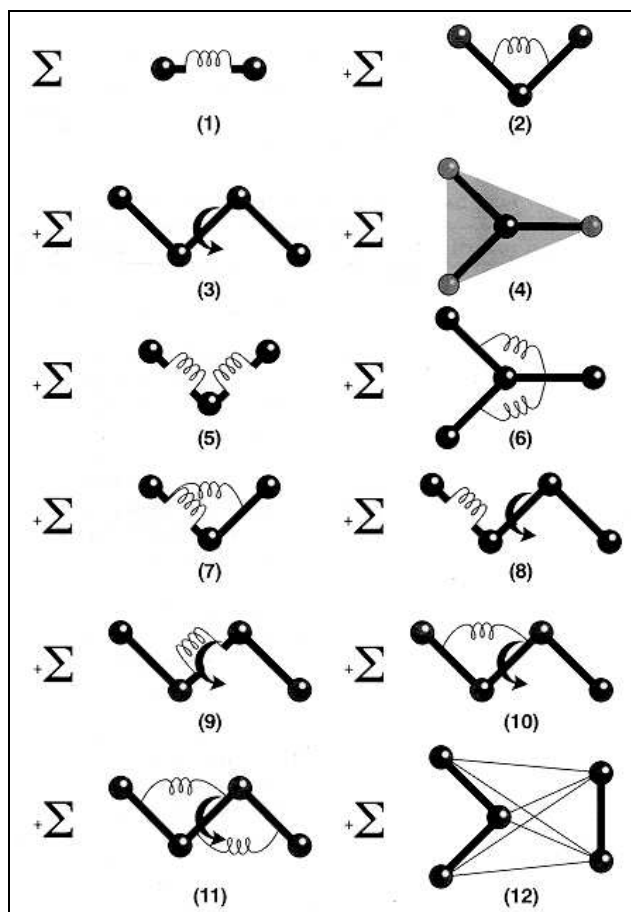


Figure 48 : Illustrations des différentes énergies d'interaction pris en compte dans le champ de force CFF91.

A. Les méthodes de détermination de la conformation d'énergie minimale

L'analyse conformationnelle d'une molécule nécessite un calcul de minimisation d'énergie afin d'obtenir la conformation d'énergie minimale qui est la plus stable et donc, la plus probable.

On peut calculer l'énergie de chaque conformère d'une molécule à partir des coordonnées internes (r, θ, ϕ) des atomes.

L'ensemble de ces couples de points (Conformère, Energie de la conformation) décrit une surface d'énergie potentielle notée SEP dont l'allure en coupe peut être analogue à celle présentée à titre d'exemple, dans la figure ci-dessous qui correspond à une coupe de la surface d'énergie potentielle de la biotine.

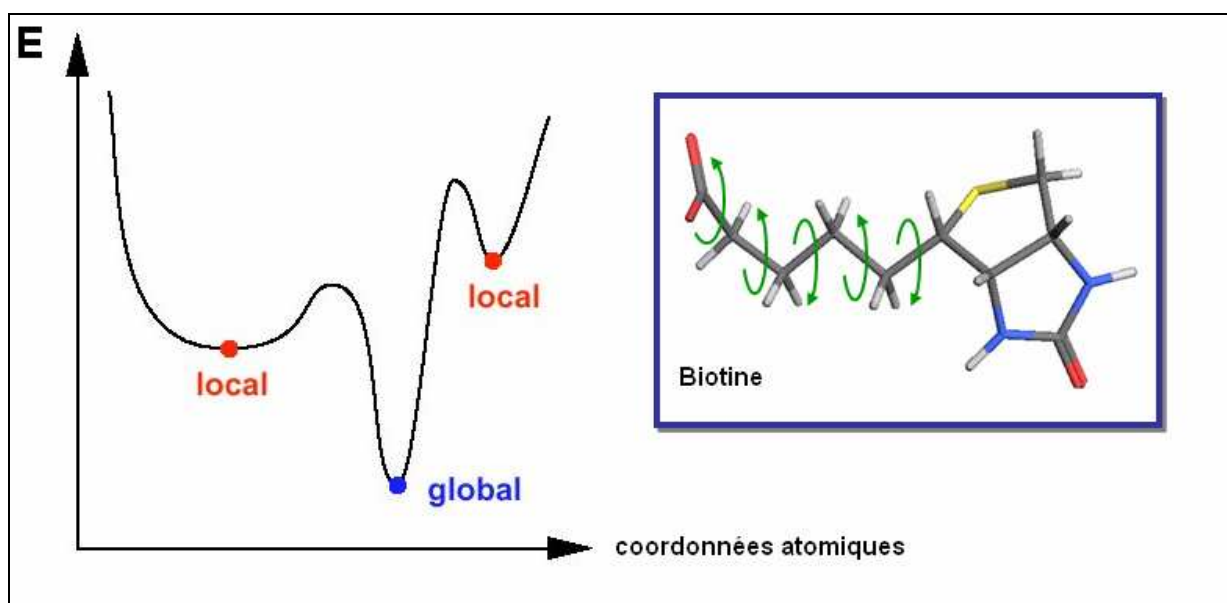


Figure 49 : coupe de la surface d'énergie potentielle de la biotine.

Une SEP peut présenter plusieurs minima dits « locaux » et un seul minimum dit « absolu » car il correspond au minimum de plus basse énergie comme le montre la Figure 49.

B. La méthode systématique : méthode de la grille

L'exploration de la SEP d'une molécule par la méthode de la grille est obtenue en faisant varier pas à pas chaque angle dièdre de la molécule.

La méthode de la grille n'est pas une méthode de minimisation d'énergie mais la détermination des minima résulte de la quasi-exploration de la SEP. Cependant, cette méthode n'est envisageable que dans le cas de molécules simples qui présentent un faible degré de

liberté. Nous pouvons citer comme exemple l'étude conformationnelle du butane. En faisant varier l'angle dièdre θ de 0 à 360° par pas de 30°, on observe le minimum d'énergie pour $\theta = 180^\circ$ qui correspond à la conformation pour laquelle la gêne stérique entre les deux groupements méthyle de la molécule est minimale (conformation décalée, Figure 50 et Figure 51).

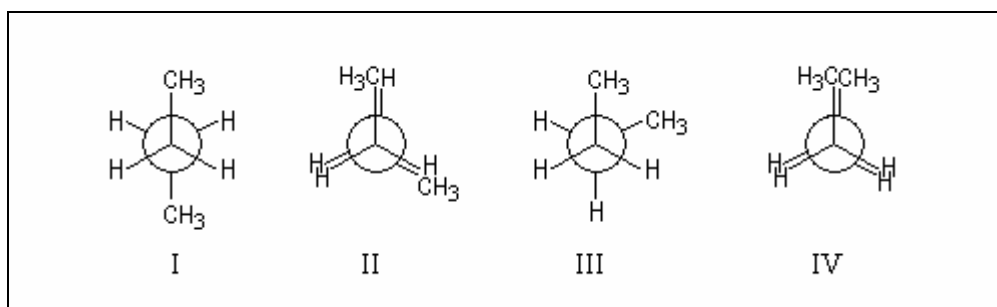


Figure 50 : Les différentes conformations du butane selon la projection de Newman.

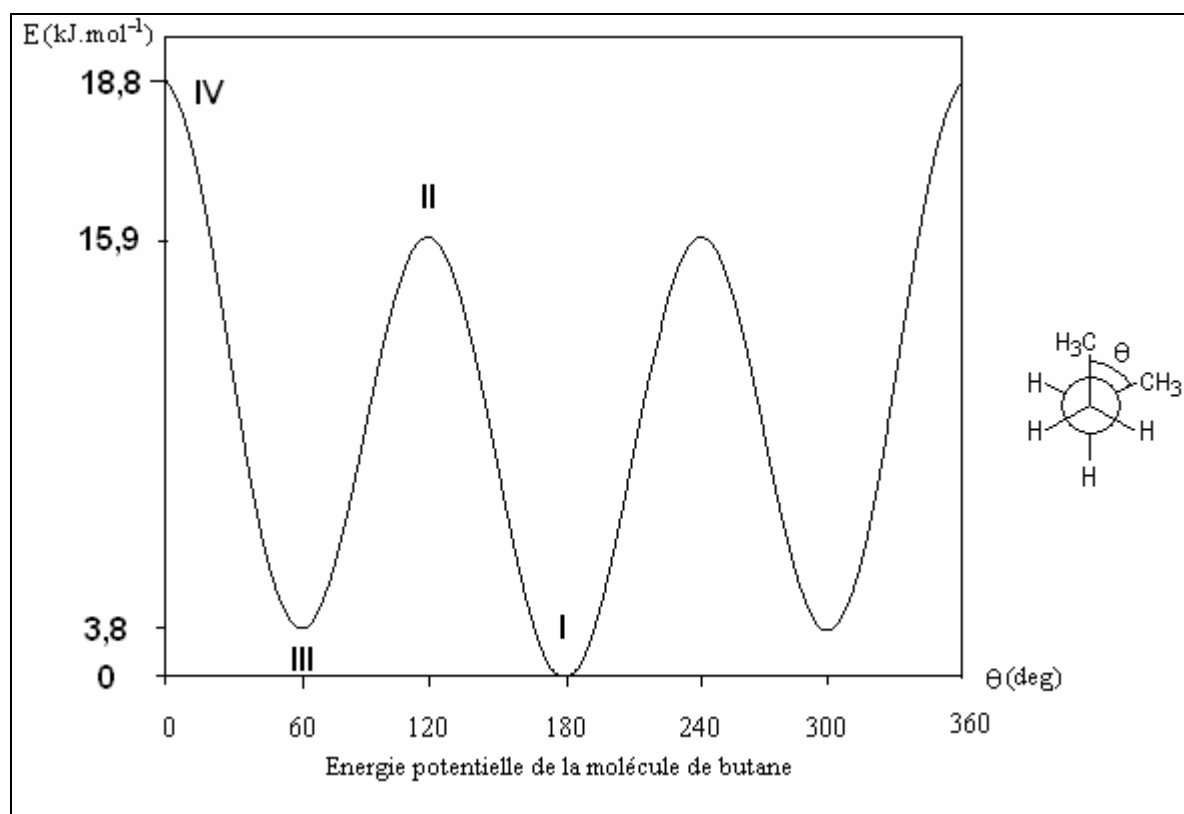


Figure 51 : Energie potentielle du butane en fonction de l'angle dièdre θ .

C. Les méthodes numériques

La minimisation de l'énergie d'une molécule est un processus itératif dans lequel les coordonnées des atomes sont constamment ajustées jusqu'à amener la structure de la molécule à une énergie minimale.

Par définition mathématique, on obtient le minimum d'une fonction T , lorsque sa dérivée première s'annule et lorsque sa dérivée seconde est positive.

Le gradient d'une fonction T ($\text{grad}(T)$) est un vecteur qui indique la direction de la croissance de la fonction T . Donc, en prenant la direction opposée au gradient, cela permet d'atteindre un minimum plus rapidement. Pour une fonction T qui possède 3 variables (x, y, z), le gradient de T s'écrit de la façon suivante :

$$\overrightarrow{\text{grad}}(T) = \vec{\nabla}(T) = \left(\frac{\partial T}{\partial x}, \frac{\partial T}{\partial y}, \frac{\partial T}{\partial z} \right)$$

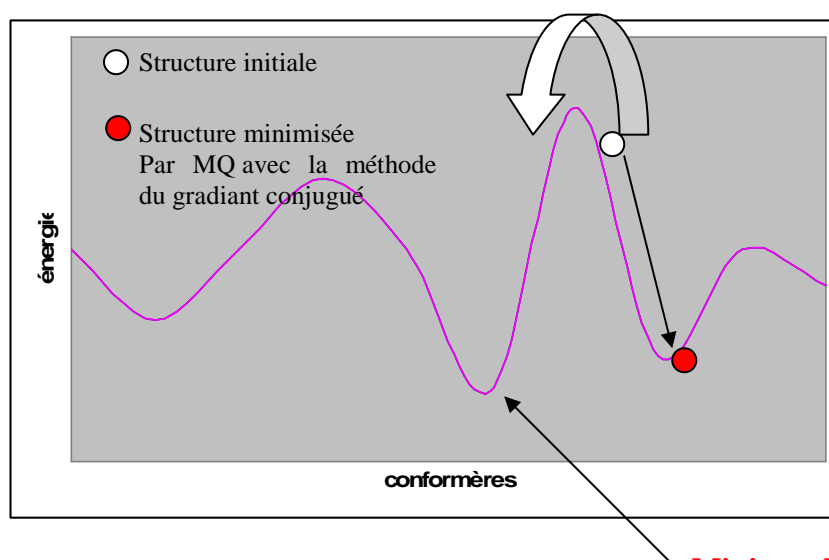
Équation 8 : Expression du vecteur $\text{grad}(T)$.

Parmi les méthodes numériques, on peut citer : la méthode de la plus grande pente (steepest descent), la méthode du gradient conjugué, la méthode de Newton Raphson.

Toutes ces méthodes sont itératives c'est-à-dire qu'elles s'arrêtent lorsque la norme du gradient de l'énergie est proche de zéro ce qui correspond à un minimum d'énergie.

Cependant, par le biais de ces méthodes, on atteint le minimum le plus proche de la structure initiale qui ne correspond pas forcément au minimum absolu du système (Figure 52).

Il est donc nécessaire de disposer de méthodes permettant d'explorer véritablement l'espace conformationnel. En franchissant les barrières d'énergie, il est possible d'obtenir la conformation la plus stable qui correspond au minimum absolu de l'énergie potentielle de la molécule (Figure 52). C'est la raison pour laquelle, on utilise des méthodes de type Monte-Carlo ou de Dynamique Moléculaire (DM) qui permettent d'échantillonner la SEP.



Minima absolu

Figure 52 : Obtention de minimum local après une minimisation de type gradient conjugué. Pour obtenir le minimum absolu, il faut fournir de l'énergie au système pour franchir les barrières d'énergie.

D. La méthode de Monte-Carlo²¹⁶

A partir d'une conformation initiale d'une molécule, on génère un ensemble de conformations obtenues par déplacement aléatoire des positions atomiques. L'utilisation de l'algorithme de Métropolis permet ensuite d'échantillonner les conformations les plus probables c'est-à-dire de plus basse énergie. L'ensemble des conformères générés est supposé représentatif de l'ensemble statistique des conformères de la molécule.

E. La Dynamique Moléculaire²¹⁷

Elle permet de simuler le mouvement de vibration des molécules (simulation de l'agitation moléculaire) par mécanique classique en appliquant les équations de mouvement de Newton en fonction du temps (Équation 9).

Un atome i de la molécule étudiée est considéré comme une masse ponctuelle m_i , sur laquelle agit une force \vec{F}_i résultant de l'ensemble des interactions entre cet atome i et le reste du système dans un intervalle de temps δt . L'énergie totale E de la molécule est dans ce cas égale à la somme des énergies potentielles et cinétiques. La trajectoire de chaque atome du système est donc obtenue par résolution de l'équation de mouvement décrite ci-dessus.

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \delta^2 \vec{E}(x_i, m_i) / \delta^2 x_i(t)$$

Équation 9 : Equation de mouvement de Newton.

Où a_i est l'accélération subit par l'atome i d'abscisse x_i dépendant du temps t .

Cette équation est applicable à un système étudié par mécanique moléculaire, puisqu'un champ de forces exprime précisément l'énergie potentielle sous forme d'une fonction des coordonnées atomiques. Il est donc à tout moment possible de calculer la force qui agit sur chaque atome et l'accélération à laquelle il est soumis. Ceci permet d'évaluer sa position et sa vitesse après un intervalle de temps donné, grâce à l'algorithme d'intégration Velocity Verlet. On peut ainsi déterminer la trajectoire de chaque atome i de la molécule en fonction du temps t (Équation 10).

²¹⁶ A. R. Leach, *Monte Carlo simulation methods, in Molecular modeling : Principles and applications*, **1996**, Addison Wesley Longman Ltd.: Harlow. p. 371-411.

²¹⁷ A. R. Leach., *Molecular Dynamics Simulation Methods, in Molecular Mechanics : Principles and applications*. **1996**, Addison Wesley Longman Ltd.: Harlow. p. 313-370.

$\text{Position de l'atome } i \text{ à l'instant } t + \Delta t : \mathbf{x}_i(t + \Delta t) = \mathbf{x}_i(t) + \Delta t \cdot \mathbf{v}_i(t) + \Delta t^2 \cdot \mathbf{a}_i(t) / 2$
--

Équation 10 : Expressions de la trajectoire et de la vitesse d'un atome i de la molécule en fonction du temps en DM

Le choix de l'intervalle Δt utilisé (souvent désigné timestep) possède une importance particulière. Un temps trop court amène de nombreuses opérations inutiles et augmentent donc les temps de calcul nécessaires à l'étude du système. Un intervalle trop long laisse les atomes parcourir une très grande distance entre deux étapes, ce qui peut notamment amener des collisions, suite à des conflits stériques entre les atomes. De manière générale, les intervalles de temps utilisés pour générer la trajectoire des atomes lors d'une simulation de dynamique moléculaire sont de l'ordre de 10^{-15} s (= une femtoseconde (Fs)). La durée d'une dynamique est en général de l'ordre de 100 picosecondes (10^5 Fs).

En début de simulation, une vitesse initiale est assignée à chaque atome, grâce à une procédure aléatoire qui simule une distribution de Maxwell-Boltzmann correspondant à une température choisie par l'utilisateur (Équation 11).

$P(v_{ix}) = (m_i / (2 \cdot \pi \cdot k_B \cdot T)) \cdot \exp [- m_i \cdot v_{ix}^2 / (2 \cdot k_B \cdot T)]$

Équation 11

Cette équation exprime la probabilité qu'un atome i de masse m_i ait une vitesse v_{ix} à la température T . Elle introduit ainsi la notion de température au sein des méthodes de dynamique moléculaire. Plus la température est élevée, plus la vitesse communiquée aux atomes sera importante. On fournit donc au système une certaine quantité d'énergie cinétique, qui lui permet de franchir les barrières d'énergie potentielle (Figure 53). Pour peu que la température soit suffisamment importante, une molécule est alors capable d'adopter toutes les conformations possibles. Dans la figure ci-dessous, l'élévation de la température jusqu'à 400K permet de franchir les barrières d'énergie et d'atteindre le minimum global, chose impossible en restant à 250 K.

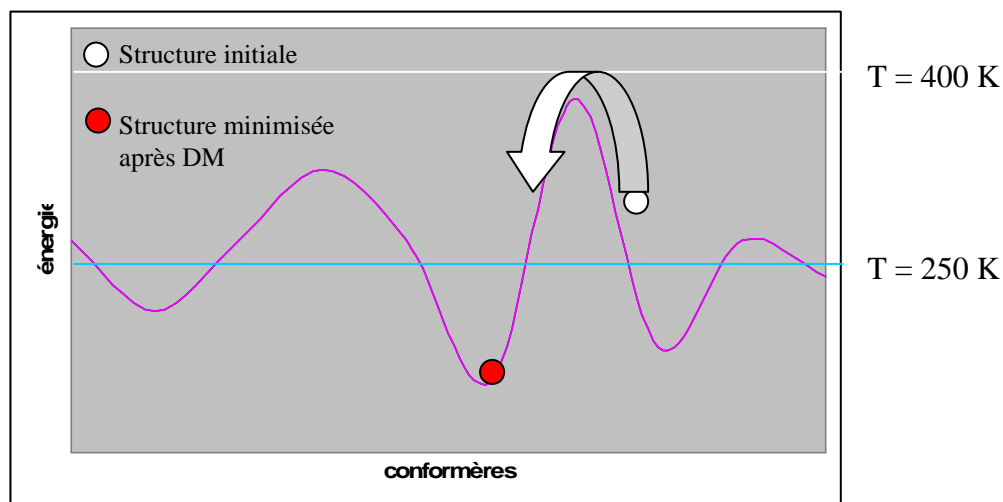


Figure 53 : Elévation de la température à 400K d'une molécule en DM permet de franchir les barrières d'énergie et d'atteindre le minimum global.

L'énergie de ces structures, générées à haute température, peut ensuite être minimisée de manière à générer un échantillon de conformations stables, qu'on espère représentatif de l'espace conformationnel de la molécule. Cette approche peut cependant fournir plusieurs structures caractérisées par une énergie potentielle importante (de haute température).

En général, une simulation de dynamique moléculaire débute par une phase de mise à l'équilibre, qui permet aux différentes variables thermodynamiques du système de se stabiliser.

F. La méthode de recuit simulé (simulated annealing²¹⁸) :

Cette technique a pour but de déterminer le minimum absolu sur la SEP. Elle s'applique en Monte-Carlo et en Dynamique Moléculaire.

Le principe du recuit simulé peut se résumer de la façon suivante : à partir d'une conformation initiale à haute température ($T = 1000\text{K}$), on simule un refroidissement par palier de température. Une diminution progressive de la température du système permet ainsi de réduire son énergie cinétique et de le forcer à occuper les états de plus basse énergie. Les structures qui correspondent à ces états peuvent alors être collectées et minimisées. L'avantage de cette technique par rapport à une simple minimisation est qu'elle laisse une certaine liberté d'évolution à la molécule étudiée, ce qui évite le confinement du système dans des minima locaux trop défavorables (de haute énergie).

²¹⁸ Kirkpatrick, S.; C.D. Gelatt; M.P. Vecchi, *Science*, **1983**, 220, 671-680.

Chapitre II L'Aspartate Aminotransférase

L'Aspartate aminotransférase (AspAT) ou Glutamate Oxaloacétate transaminase (GOT) est une aminotransférase spécifique vis-à-vis des couples L-Asp/OA et L-Glu/KG. Elle catalyse la réaction réversible de transamination entre ces deux couples (Figure 54). Parmi les ATs, ce sont les enzymes les plus étudiées aussi bien sur le plan structural que mécanistique.

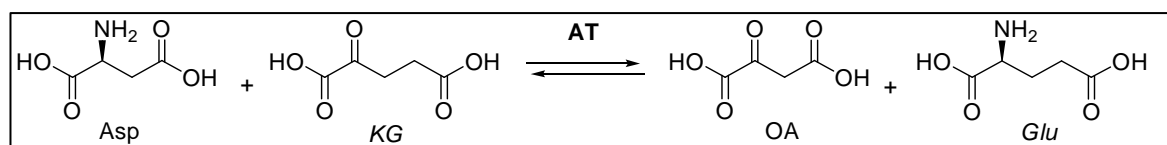


Figure 54 : réaction catalysée par l'AspAT.

II.1 Origine

L'AspAT est une enzyme présente chez tous les êtres vivants et est essentielle au métabolisme primaire. Il existe deux types d'AspAT chez les eucaryotes²¹⁹ : une cytosolique (cAspAT) et une mitochondriale (mAspAT). Elles ont une spécificité de substrat et des structures différentes. En effet, elles ne comportent pas le même nombre d'acides aminés et présentent seulement 45 à 50 % d'homologie de séquence.

Les AspATs microbiennes comme l'AspAT d'*E.Coli* offre un plus large spectre de substrat que les AspATs d'origines animale ou végétale. En plus des L-Asp et L-Glu, l'AspAT d'*E.coli* présente une activité significative vis à vis de la L-phenylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, L-leucine et de la L-méthionine.

Les diverses spécificités de substrat des AspATs d'origine animale et d'*E.Coli* peuvent s'expliquer par leurs importantes différences structurales. Par exemple, la comparaison des séquences d'acides aminées des AspATs extraites de porc ou de poulet à celle d'*E.Coli* révèle seulement une homologie d'environ 40 % !

II.2 Structures

Actuellement, une centaine de structures tridimensionnelles d'AspAT sont répertoriées dans la Protein Data Bank (PDB).

Quelque soit son origine, l'AspAT se présente sous la forme d'un dimère qui présente un poids moléculaire de 90 000 Dalton environ. Chaque sous-unité contient environ 400

²¹⁹ A.E. Braunstein, The enzymes, 3^{ème} Ed, Edited by P.D. Boyer, **1973**, 9, 379-481.

acides aminés et est composée d'un grand domaine (résidus 48 à 325), d'un petit domaine (résidus 15 à 47 et 326 à 410) ainsi que d'un bras N-terminal (résidus 1 à 14, Figure 55).

Chaque sous-unité possède un site actif qui se situe à l'interface des deux sous-unités, entre le petit et le grand domaine. Le site actif renferme le coenzyme PLP (Phosphate de pyridoxal) qui se lie de façon covalente au substrat. De plus, la nature des acides aminés du site actif reste identique d'une AspAT à l'autre. Ces résidus jouent un rôle essentiel dans la réaction de transamination.

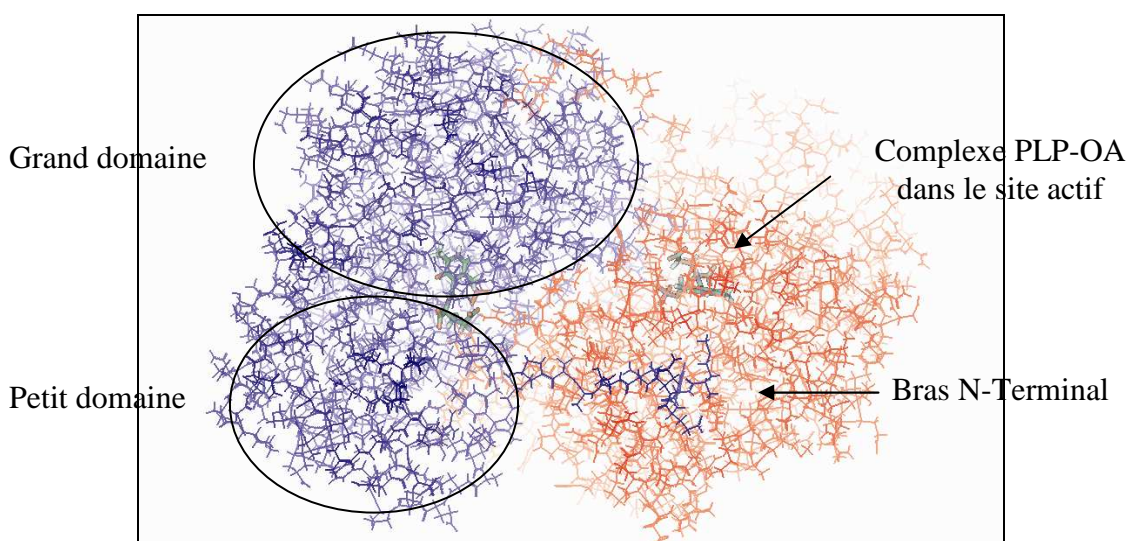


Figure 55: structure de l'AspAT d'*E.Coli* sous la forme fermée (origine : fichier 1ARG de la PDB)
 en bleu : chaîne A, en rouge : chaîne B.

L'enzyme peut adopter plusieurs conformations : une forme ouverte qui facilite l'entrée et la sortie du substrat et une forme fermée qui permet d'isoler le substrat du milieu extérieur (généralement de l'eau) et de catalyser la réaction de transamination.

Les substrats dicarboxyliques (Asp/OA et Glu/KG) sont fixés par interactions ioniques entre les arginines 292^{*220} et 386 qui vont les positionner correctement dans le site actif pour la transamination. Lors de la fermeture de l'enzyme, le petit domaine effectue alors une rotation de quelques degrés par rapport au grand domaine et l'hélice proche du bras N-terminal, se déplace afin de compléter la fermeture de l'enzyme. L'angle de rotation est de l'ordre de 5 à 6 degrés pour l'AspAT d'*E.Coli*²²¹ et de 13 degrés pour les enzymes d'origines

²²⁰ * indique que le résidu fait parti de l'autre sous-unité de l'enzyme.

²²¹ A. Okamoto et al. *J.Biochem.* (Tokyo), **1994**, 116, 95-107.

animales²²² telles que la mAspAT de poulet²²³ (Figure 56). L'hélice du petit domaine fait alors office de « porte » qui va se refermer sur le substrat en le piégeant dans le site actif.

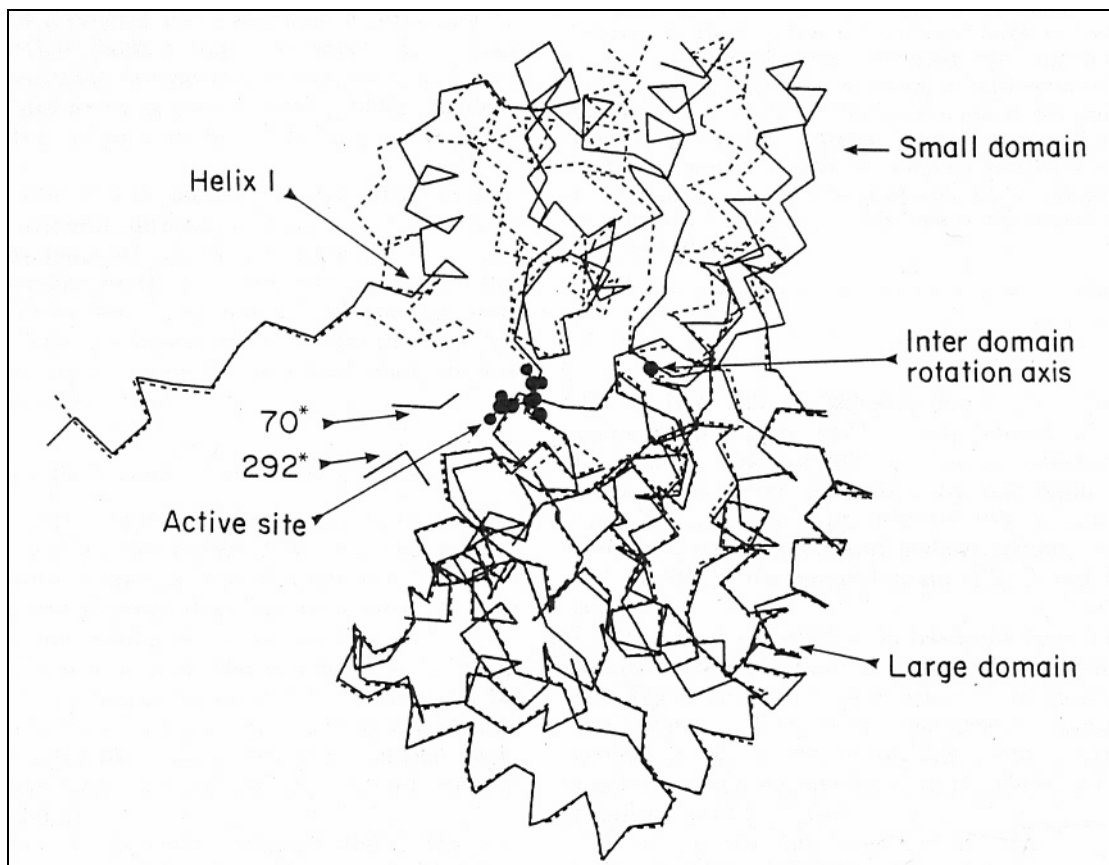


Figure 56 : Fermeture de la mAspAT de poulet¹⁶. En pointillé : structure du site correspondant à la forme ouverte de l'enzyme, en trait plein : structure du site actif correspondant à la forme fermée de l'enzyme.

II.3 Etude du site actif

II.3.1 Etude mécanistique : caractérisation des intermédiaires réactionnels

La plupart des études effectuées sur le mécanisme de la transamination enzymatique des transaminases ont concerné l'AspAT. Le mécanisme fait intervenir trois intermédiaires réactionnels : l'aldimine externe, l'intermédiaire quinonoïde et la cétimine (une imine). La figure ci-dessous décrit la première demi-réaction où le substrat donneur se fixe au PLP en formant l'intermédiaire aldimine externe, qui, à la suite d'échange 1,3 protique catalysé par la Lysine 258, donne l'intermédiaire cétimine qui s'hydrolyse en pyridoxamine phosphate (PMP) et le cétoacide correspondant. Le substrat accepteur se fixe ensuite sur le PMP pour former à nouveau le cétimine. Le schéma réactionnel de la seconde demi-réaction est le même que celui de la première à part que son sens est inversé.

²²² J. N. Jansonius and M. G. Vincent, *Biol. Macromol. Ass.*, **1987**, 57-74 and D. E. Metzler, *Transaminases*, **1985**, 138-164.

²²³ C.A. McPhalen, M. G. Vincent, D. Picot, J. N. Jansonius, *J. Mol. Biol.*, **1992**, 227, 197-213.

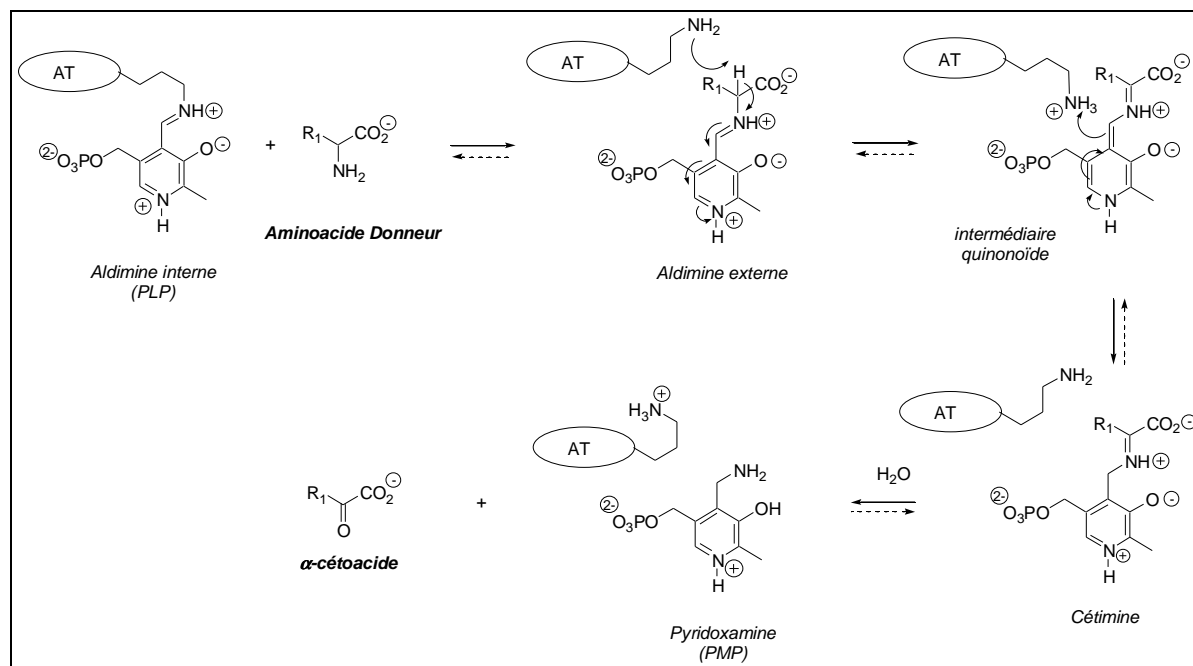


Figure 57 : Première demi-réaction : conversion du pyridoxal phosphate (PLP) en pyridoxamine phosphate (PMP).

De nombreuses études spectroscopiques (les intermédiaires absorbent à des longueurs d'onde λ différenciables comprises entre 300 et 500 nm), cristallographiques, RMN (1H , ^{13}C et ^{31}P) ont été réalisées afin de prouver l'existence de ces intermédiaires et d'analyser leur structure. Cependant, ces derniers ont des durées de vie très courtes, ce qui ne facilite pas leurs études. Plusieurs méthodes ont été utilisées :

Les analogues de substrats naturels formant des complexes inhibiteurs de l'enzyme peuvent mimer les différents intermédiaires. La cocrystallisation (couplée à des études spectrométriques et de diffraction des rayons X (DRX)) de l'enzyme avec le succinate, le glutarate et le maléate²²⁴ a permis l'étude du processus de fermeture de l'enzyme ainsi que l'étude de l'intermédiaire aldimine interne. Le 2-méthylaspartate ou encore le 2-hydroxyméthylaspartate²²⁵ peuvent mimer les complexes de type aldimine externe : en effet l'intermédiaire aldimine formé entre le PLP et ces analogues α -alkylés d'Asp ne peuvent pas subir de déprotonation conduisant à l'intermédiaire quinonoïde.

Enfin l'érythro 3-hydroxyaspartate²²⁶ stabilise l'intermédiaire quinonoïde en formant deux liaisons hydrogène avec le résidu Tyr70 et le groupement phosphate du coenzyme²²⁷. La

²²⁴ A. E. Braunstein, *The enzymes*, **1973**, 3rd edition, vol. 9, pp 379-481, Academic press, New York.

²²⁵ P. Fasella, A. Giartosa, G. G. Hammes, *Biochemistry*, **1966**, 5, 197-202.

²²⁶ W. T. Jenkins, *J. Biol. Chem.*, **1961**, 236, 1121-1125 et Y. Morino, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.*, **1967**, 242, 2800-2809.

²²⁷ J. F. Kirsch, *J. Mol. Biol.*, **1984**, 174, 497-525 and H. Hayashi, H. Kagamiyama, *Biochem.* **1995**, 34, 9413-9423.

de demi-vie de l'intermédiaire est alors suffisante pour l'observer par spectrophotométrie. Cependant aucun autre inhibiteur n'a permis l'étude de l'intermédiaire cétimine.

Une étude cristallographique portant sur des intermédiaires thermodynamiquement stables a permis la détermination structurale des complexes cétimines formés entre l'aspartate, le glutamate et la mAspAT de cœur de poulet²²⁸. De même, l'étude de l'intermédiaire aldimine formée entre l'AspAT d'*E.coli* et l'Asp, second intermédiaire thermodynamiquement le plus stable, a été effectuée²²⁹.

Pour ralentir la vitesse de transamination et ainsi rallonger la durée de vie des intermédiaires réactionnels, la cryoenzymologie a été une alternative pour étudier les intermédiaires enzyme-substrat²³⁰.

II.3.2 Étude par mutagenèse : rôles des acides aminés du site actif

Le site actif se présente comme une cavité qui stabilise le ligand coenzyme-substrat par d'importantes interactions principalement de type Van Der Waals et ioniques. Cette cavité est formée des acides aminés suivants : La **Lysine** Lys258, les **Arginines** Arg266, 292*²³¹ et 386, la **Tyrosine** Tyr70*, le **Tryptophane** Trp140, la **Tyrosine** Tyr225, l'**Aspartate** Asp222, l'**Asparagine** Asn194 et l'**Histidine** His143 (Figure 58). La nature de ces 11 résidus reste invariante d'une AspAT à l'autre et est essentielle à la stabilité du complexe coenzyme-substrat ainsi qu'à l'activité catalytique de l'enzyme.

²²⁸ V. N. Malashkevich, M. D. Toney, J. N. Jansonius, *Biochemistry*, **1993**, 32, 13451-13462.

²²⁹ R. Graber et al., *Eur. J. Biochem.* **1995**, 232, 686-690.

²³⁰ M. Sterk, H. Gehring, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 201, 703-707.

²³¹ Les acides aminés appartenant à la seconde sous unité seront notés par une *

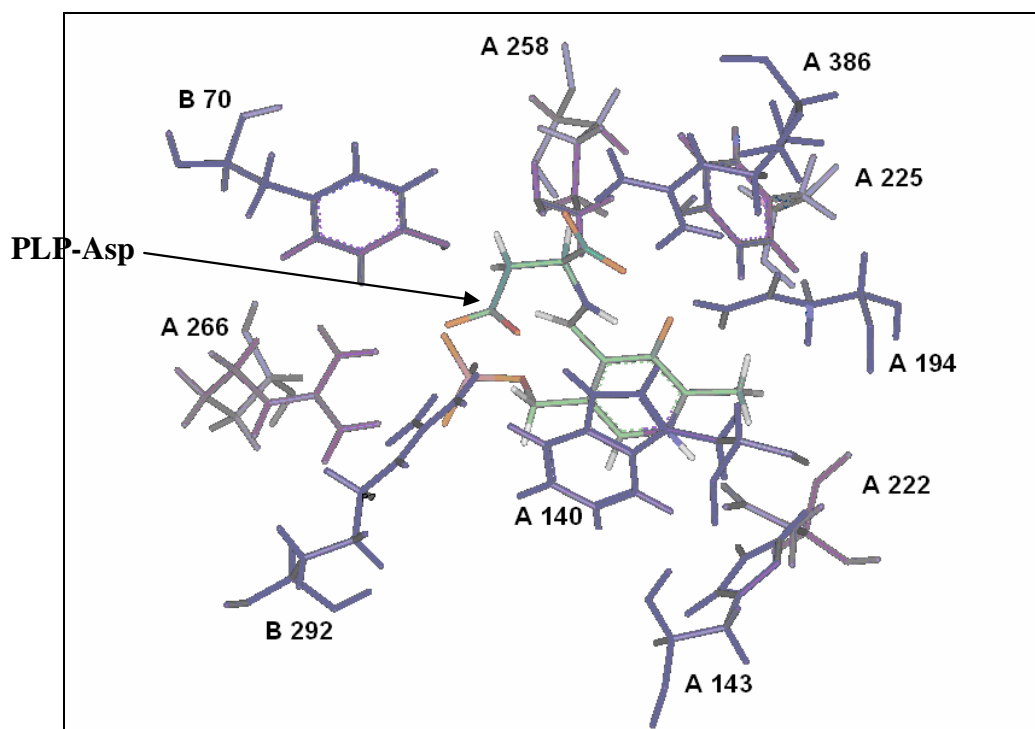


Figure 58: Site actif de l'AspAT d'*E. coli* qui renferme le ligand PLP-Asp sous la forme d'aldimine externe (origine : fichier 1ARG de la PDB).

Les acides aminés qui constituent le site actif ont été étudiés par mutagenèse dirigée afin de définir leur rôle respectif dans la fixation du substrat et dans la catalyse. Dans la plupart des cas, les travaux de mutagenèse ont été effectués sur l'AspAT d'*E. coli* car elle est facilement et abondamment extraite de souches génétiquement modifiées. Par ailleurs, sachant que les résidus du site actif restent invariants d'une AspAT à l'autre, on peut raisonnablement penser que les résultats et observations effectués avec l'enzyme d'origine bactérienne peuvent être extrapolés aux AspATs d'origine différente.

A. La lysine 258

La Lysine 258 (Lys258) est le résidu du site actif le plus étudié car il est présent dans le site actif de toutes les enzymes PLP-dépendantes. Chez l'AspAT, le résidu 258 est lié de façon covalente au PLP formant ainsi une base de Schiff appelée aldimine interne.

Le tableau suivant présente les constantes de Michaelis (K_m) pour les mutants Lys 258Ala²³², Lys258Met¹¹, Lys258Cys¹¹.

²³² M. D. Toney, J. F. Kirsch, *Biochem.*, **1989**, 28, 8161-8167, M. D. Toney, J. F. Kirsch, *Biochem.*, **1993**, 32, 1471-1479.

	AspAT sauvage	Lys 258-Ala	Lys258-Met	Lys258-Cys
K_m (mM)				
OA	0,3	0,97	0,51	0,53

Tableau 32

Ces mutants conservent une bonne affinité vis à vis des substrats naturels tels que l'oxaloacétate (OA). D'après des études par DRX, les AspAT mutées ont des structures similaires à celle d'origine sauvage mis à part qu'en l'absence de lysine, le PLP se trouve sous une forme libre. Cela montre donc que la forme aldimine interne n'est pas nécessaire à la fixation du substrat dans le site et que cette fixation peut se faire sur le PLP sous forme libre.

Cependant, la mutation de la lysine par d'autres résidus comme ceux décrits précédemment ou encore par l'Arginine²³³ entraîne une diminution de l'activité (k_{cat}) d'un facteur de 10^6 à 10^8 par rapport à l'activité de l'enzyme sauvage vis-à-vis des substrats naturels. La Lys 258 intervient donc au niveau de la catalyse enzymatique.

Par spectrophotométrie, on peut suivre la formation et la disparition des différents intermédiaires réactionnels qui sont caractérisés par leur longueur d'onde d'absorption (aldimine interne absorbe à 355 nm, le complexe PLP-Asp sous forme d'aldimine externe à 421 nm, sous forme cétimine à 323 nm et sous forme quinonoïde à 330 nm) et ainsi déterminer leur vitesse de formation ou de disparition. Les vitesses de l'équilibre tautomérique existant entre l'aldimine externe et la cétimine est très faible chez les AspAT mutées, ce qui limite leur activité enzymatique. De plus, les mutants Lys258-Met ainsi que Lys258-Ala²³⁴ retrouvent une activité enzymatique partielle en ajoutant au milieu réactionnel une amine primaire telle que l'éthylamine qui joue ainsi le rôle de catalyseur acide-base (Figure 59).

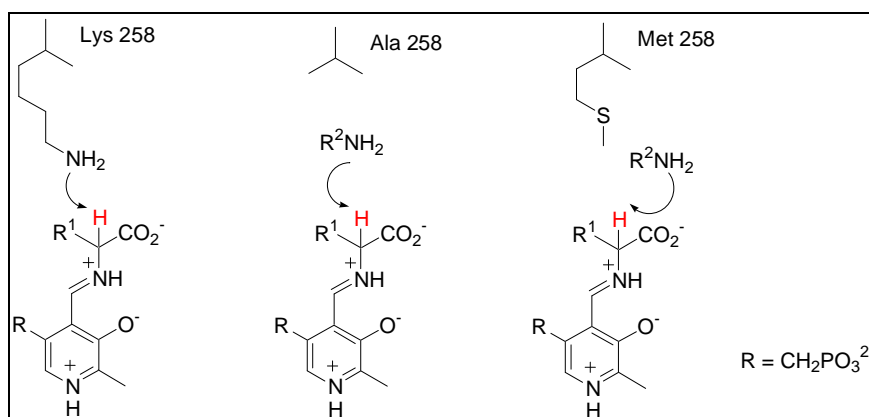


Figure 59

²³³ M. D. Toney, J. F. Kirsch, J. Biol. Chem., 1991, 266, 23900-23903.

²³⁴ M. D. Toney, J. F. Kirsch, Annals New York Academy of Sciences, 1990, 48-57.

Ainsi la Lys 258 catalyse la transposition prototropique (1,3) qui permet le passage de l'aldimine externe à la cétimine et vice versa. Le résidu Lys 258 est donc indispensable à l'activité catalytique de l'AspAT.

Une autre étude a été effectuée sur le mutant Lys258His²³⁵ de la mAspAT de poulet. Ce mutant accepte les substrats naturels tel que l'Asp ou l'OA et conserve une activité seulement 5 fois inférieure à celle d'origine. L'histidine est donc capable de mimer la lysine en catalysant l'échange de proton entre les différents intermédiaires de la transamination.

B. Les arginines 292* et 386

Des études cristallographiques portant sur l'analyse structurale des complexes AspAT-Asp²³⁶ ont montré que 3 arginines interagissent via leur groupe guanidinium avec le complexe PLP-substrat.

L'Arg 386 forme un pont salin avec le groupement carboxylate α du substrat, l'Arg 292* appartenant à la sous unité voisine, interagit de la même façon avec le second carboxylate ω du substrat (β pour l'Asp et γ pour le Glu). Quant à l'Arg 266, elle stabilise le groupement phosphate du PLP en formant deux liaisons de type ionique (Figure 60).

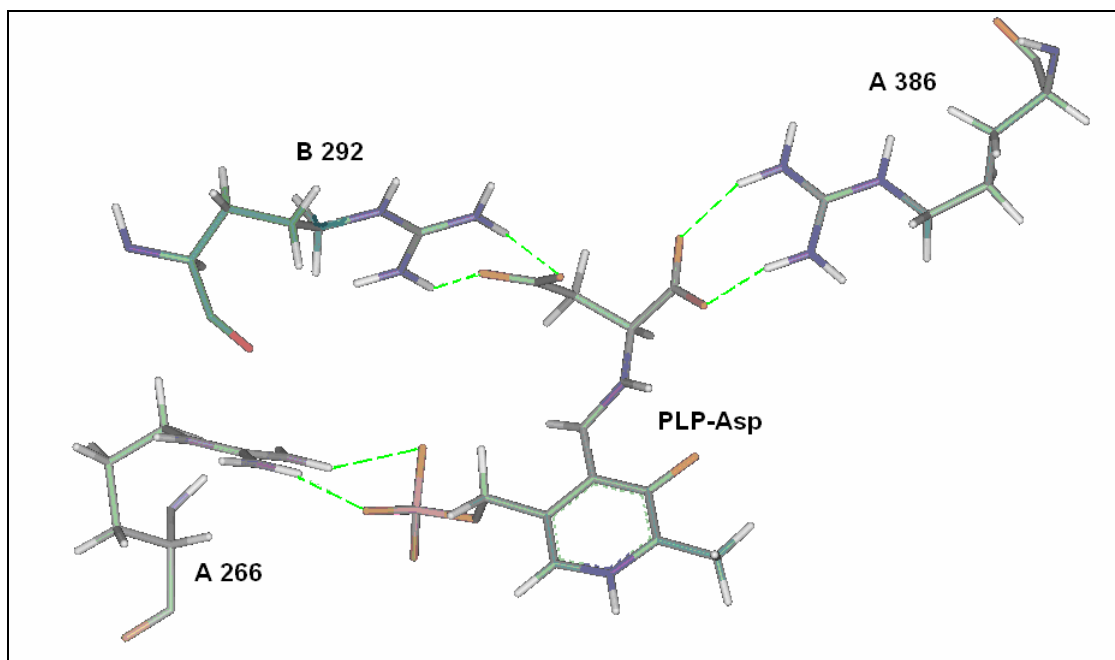


Figure 60 : interactions des arginines 386, 266 et 292* avec le complexe PLP-Asp de l'AspAT d'*E. Coli* sous la forme aldimine externe (origine : fichier 1ARG de la PDB). Les pointillés représentent les liaisons hydrogènes.

²³⁵ M. Ziak, R. Jaussi, H. Gehrinf, P. Christen, *Eur. J. Biochem.*, **1990**, 187, 329-333.

²³⁶ G. C. Ford, G. Eichele, J. N. Jansonius, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, 77, 2559-2563.

Le rôle des arginines du site actif a tout d'abord été étudié par modification chimique de l'enzyme en utilisant la 1,2-cyclohexanedione, la 2,3-butanedione²³⁷ et la phénylglyoxal marqué au carbone 14²³⁸. Ces dérivés α -dicarboxylés sont connus pour former des complexes stables par réaction avec le groupement guanidinium des arginines. Le phénylglyoxal a, quant à lui, la particularité de réagir sélectivement avec l'Arg 292*. Dans tous les cas, les AspAT modifiées montrent une affinité médiocre vis à vis des substrats dicarboxylés ainsi qu'une faible activité. Cependant, leurs paramètres cinétiques restent inchangés dans le cas de substrats monocarboxylés comme l'Alanine. L'Arg 292 est donc indispensable à l'activité de l'AspAT vis à vis des substrats dicarboxylés en stabilisant son groupement carboxylate ω .

Par la suite, les arginines du site actif ont fait l'objet de plusieurs études par mutagenèses dirigées afin de mieux comprendre leur rôle spécifique au niveau de la catalyse enzymatique.

❖ Mutation de l'Arg 292*

Cronin et al. ont remplacé l'Arg 292* de l'AspAT d'*E.Coli* par un résidu Asp^{239,240}. En 1997, Kirsh et al.²⁴¹ ont également muté ce résidu 292 en homoglutamate afin de rendre l'acide α -amino- β -guanidinopropionique (AGPA) substrat de l'AspAT. Ces changements de résidu en position 292 par des aminoacides chargés négativement, entraînent une inversion de charge et provoque une diminution de l'activité vis à vis des substrats naturels dicarboxylés tels que l'Asp et le Glu. En revanche, les aminoacides cationiques comme la L-Arg ont une meilleure affinité avec l'enzyme mutée du type AspAT (Arg292*-Asp) qu'avec l'enzyme sauvage (Tableau 33).

Aminoacides substrats	kcat/Km (s ⁻¹ M ⁻¹)	
	AspAT d' <i>E.Coli</i> sauvage	AspAT (Arg292*- Asp)
L-Asp	34 500	2 10 ⁻⁶
L-Glu	4790	2 10 ⁻⁶
L-Arg	0,03	15,5
L-Orn	0,01	12,8
L-Lys	0,02	8,5
L-Phe	368	0,215
L-Tyr	829	0,152

Tableau 33 : spécificité de substrats de l'AspAT sauvage et du mutant AspAT (Arg292*-Leu)

²³⁷ H. F. Gilbert, M. H. O'Leavy, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, 67, 198-202.

²³⁸ E. Sandmeier, P. Christen, J. Biol. Chem., 1982, 257, 6745-6750.

²³⁹ Cronin et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 2222-2223.

²⁴⁰ Cronin et al. *Biochem.*, **1988**, 27, 4572-4579.

²⁴¹ Kirsh et al., *Biochem.*, **1997**, 36, 10517-10525.

Cette étude prouve donc bien que l'Arg 292* est le seul résidu responsable de la spécificité de substrat de l'AspAT vis-à-vis des aminoacides dicarboxylés.

Des substitutions de l'Arg 292* de l'AspAT par des aminoacides neutres comme la valine ou la leucine²⁴² ont montré que l'AspAT mutée n'avait plus la même spécificité de substrats acceptant ainsi préférentiellement les acides aminés monocarboxylés aromatiques plutôt que les substrats dicarboxylés (Tableau 34).

Aminoacides substrats	kcat/Km en s ⁻¹ M ⁻¹		
	AspAT d' <i>E.Coli</i> sauvage	AspAT (Arg292*- Val)	AspAT (Arg292-Leu)
L-Asp	131 000	0,72	0,82
L-Glu	18 000	0,05	0,10
L-Phe	198	2110	2090
L-Tyr	687	3840	4000
L-Trp	877	10100	7840

Tableau 34: étude de spécificité de substrats des mutants AspAT (Arg292*-Val), AspAT (Arg292-Leu) et de l'enzyme sauvage.

Les mutations de l'Arg292* avec des résidus de plus petites tailles tels que l'alanine ou la glycine présentent des paramètres cinétiques similaires à ceux des mutants exposés ci-dessus, même si on pouvait s'attendre à une augmentation de l'affinité pour les substrats plus volumineux. En résumé, l'élimination de la charge du résidu 292* génère un microenvironnement hydrophobe favorable à la fixation des substrats aromatiques.

❖ Mutation de l'Arg 386

L'Arginine 386 est responsable de la fixation de la fonction carboxylate α des substrats aminoacides. Le tableau ci-dessous expose le rapport des paramètres cinétiques (k_{cat}/K_m) entre l'AspAT mutée sur cette position et l'enzyme sauvage.

Aminoacides substrats	Rapport (k_{cat}/K_m du mutant) / (k_{cat}/K_m de AspAT sauvage) $\times 10^{-5}$		
	AspAT (Arg386- Lys) ²⁴³	AspAT (Arg386- Phe) ²⁴⁴	AspAT (Arg386- Tyr) ²⁴
L-Asp	6,2	1,6	2,9
L-Glu	39	0,05	0,22

Tableau 35 : étude de spécificité de substrat des mutants l'Arg386.

²⁴² H.Hyashi, S. Kuramitsu, Y. Inoue, Y. Morino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1989**, 159, 337-342.

²⁴³ Y. INOUE et al. *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 9673-9681.

²⁴⁴ A. T. DANISHEFSKY et al. *Biochem.*, **1991**, 30, 1980-1985.

La mutation de l'Arg386 par des résidus neutre tels que la Phe ou la Tyr entraîne une importante diminution de l'activité de l'enzyme. De plus, le fait de remplacer l'Arg386 par un résidu cationique tel que la Lys n'entraîne qu'une faible amélioration de l'activité du mutant AspAT (Arg386-Lys) par rapport aux mutants AspAT (Arg386-Phe) et AspAT (Arg386-Tyr).

Le groupement guanidinium de l'Arg386 permet non seulement d'établir une forte stabilisation du groupement carboxylate du substrat, mais aussi d'assurer un alignement du substrat favorable à une catalyse enzymatique efficace.

De plus, il s'avère que l'Arg 386 participe indirectement à l'abaissement du pKa du complexe PLP-substrat. L'Asn194 interagit avec l'Arg 386 et avec l'oxygène phénolique ($O^{3'}$) du PLP qui a pour effet de diminuer le pKa du coenzyme (Figure 61).

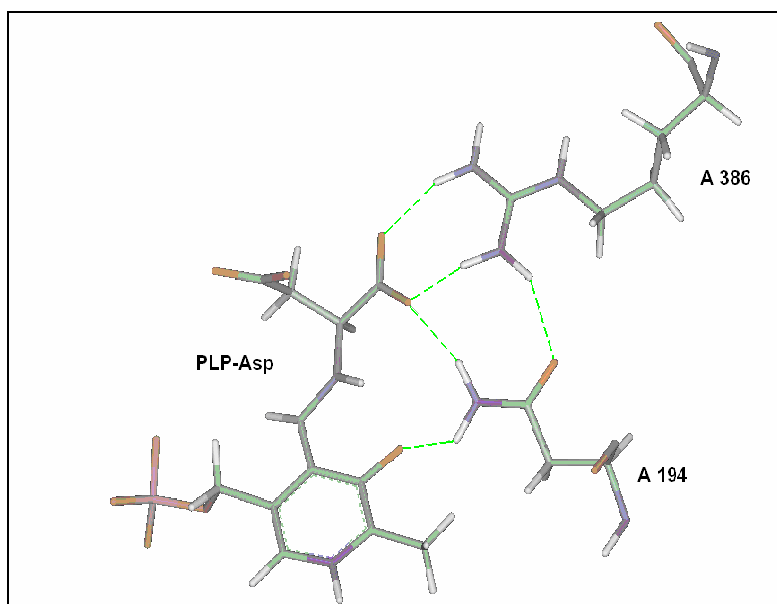


Figure 61 : interactions existants entre l'Arg 386 et l'Asn 194.

L'absence de liaison hydrogène entre le résidu 386 et l'Asn 194 chez les mutants entraîne non seulement des modifications électrostatiques mais aussi conformationnelles. En effet, par comparaison des structures cristallines du mutant Arg386Phe et de l'enzyme sauvage, la chaîne latérale du résidu 194 subit une rotation de 25°. Cette rotation affaiblit la liaison hydrogène existant entre l'Asn 194 et $O^{3'}$ du coenzyme, ce qui a pour conséquence d'augmenter le pKa du PLP et donc de diminuer sa réactivité dans le processus de la catalyse.

Une étude récente²⁴⁵ a montré que la mutation des arginines en positions 292* et/ou 386 par des lysines favorise des réactions secondaires qui sont quasi inexistantes lors de la transamination avec l'enzyme sauvage. En effet, les taux de racémisation des aminoacides et de décarboxylation du L-Asp sont beaucoup plus importants dans le cas des mutants Arg292-

²⁴⁵ P. Christen et al., J. Biol. Chem., 1997, 35, 21932-21937.

Lys et Arg386-Lys (Schéma 153). En 2001, H. Kagamiyama et al. ont cumulé les mutations des Arg386 et Arg292 avec la mutation Asn194-Ala afin de mieux comprendre les effets électrostatiques réels des deux résidus arginines sur l'aldimine interne. Ils en déduisent que les effets électrostatiques des résidus 386 et 292* portant sur le pKa de l'imine du coenzyme sont moins importants que ceux de l'Asp222 et de la Tyr225.

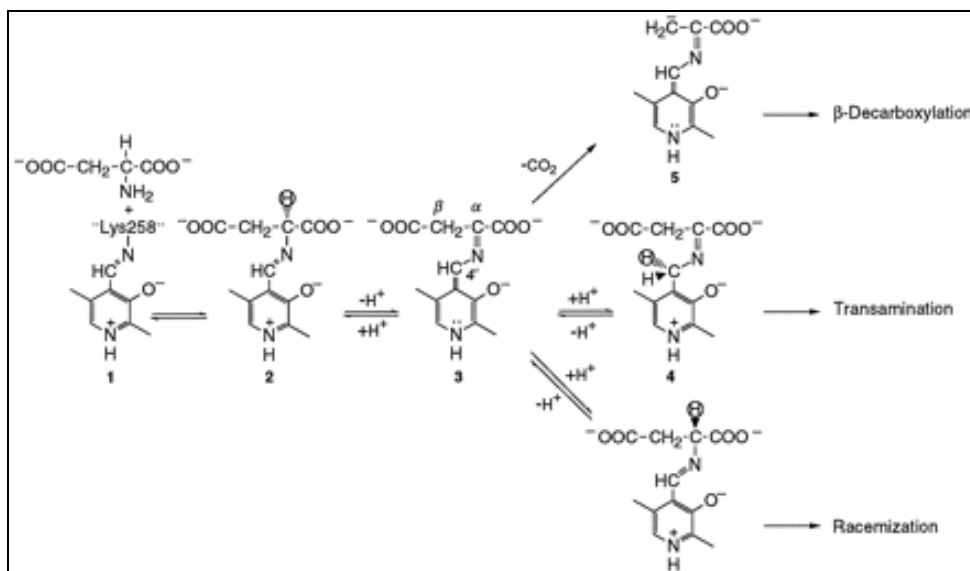


Schéma 153 : Réactions secondaires catalysées par des mutants de l'AspAT²³³.

Les Arginines 292* et 386 sont donc essentielles à la fixation ainsi qu'à la stabilisation des substrats dicarboxylés. Ce sont les résidus qui bougent le plus lors de la fermeture de l'enzyme (de 4 à 7 Å de leur position initiale). Tout au long de la transamination, ils assurent une certaine orientation du substrat par rapport au coenzyme pour une catalyse optimale²⁴⁶ (Figure 62).

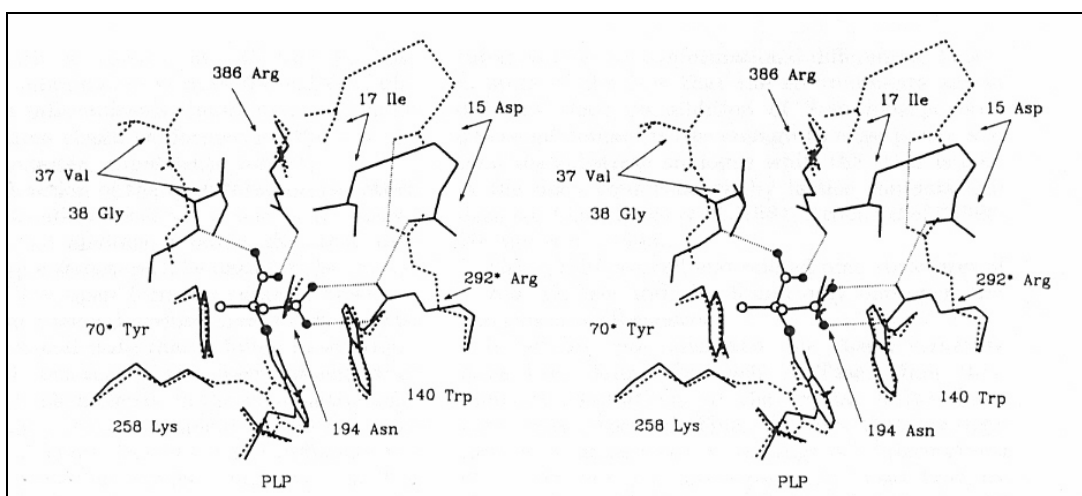


Figure 62 : superposition des structures du site actif de la mAspAT de poulet sous ses formes fermée et ouverte¹⁶. En pointillé : structure du site de la forme ouverte de l'enzyme, en trait plein : structure du site actif de la forme fermée de l'enzyme.

²⁴⁶ C. A. McPhalen et al. *J. Mol. Biol.*, **1992**, 227, 197-213.

C. La Tyrosine 70*

Les analyses par DRX ont toujours décrit la tyrosine, quelque soit l'origine de l'AspAT, proche de la lysine 258 et participant à une liaison hydrogène entre son groupement hydroxyle et le groupement phosphate du coenzyme. De part sa proximité avec la lysine 258, Kirsch et al.²⁴⁷ ont émis l'hypothèse qu'elle pouvait intervenir dans la catalyse du transfert de proton permettant l'équilibre aldimine-cétimine.

Cette hypothèse a été réfutée par des études de mutagenèse dirigée où la Tyr70* a été remplacée par les résidus Phe^{26,248,249} et Ser²⁵⁰. La comparaison des paramètres cinétiques mesurés pour les AspAT d'*E.Coli* sauvage et mutées est présentée dans le tableau suivant.

AspAT	Km Asp (mM)	Km KG (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)
Sauvage	2	0,6	200
Tyr70-Phe	12	3,8	29
Tyr70-Ser	5	36	7,4
Tyr70-His	3,7	15,5	26

Tableau 36

L'activité catalytique (k_{cat}) des mutants Tyr-Phe70 et Tyr-Ser70 est égale respectivement à 15 et 4 % de l'activité d'origine. Le mutant Tyr-His70²⁵¹ présente une activité de 13 % par rapport à celle de l'AspAT sauvage. La mutation de la tyrosine 70 entraîne donc une diminution de l'activité beaucoup moins importante que dans le cas de la mutation de la Lys 258 par une arginine. On peut donc en déduire que la Tyrosine reste un résidu essentiel à la catalyse mais n'est pas indispensable à la catalyse de l'équilibre aldimine-cétimine.

Des études par spectrophotométrie ont aussi montré que le fait d'éliminer le groupement phénol en position 70 entraîne une moins bonne stabilité des intermédiaires réactionnels formés avec des substrats inhibiteurs.²⁵² Par exemple, l'absence de liaison hydrogène entre la Tyr70* et le 3-β-hydroxyaspartate diminue la stabilité de l'intermédiaire quinonoïde⁴¹ (Figure 63).

²⁴⁷ J. F. Kirsch, G. Eichele, G. Ford, M. G. Vincent, J. N. Jansonius, H. Gehring, P. Christen, *J. Mol. Biol.*, **1984**, 174, 497-525.

²⁴⁸ M. D. Toney, J. F. Kirsch, *Biochem.*, 1991, 30, 7456-7461 et M. D. Toney, J. F. Kirsch, *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 12403-12405.

²⁴⁹ M. D. Toney, J. F. Kirsch, *Biochem.*, **1991**, 30, 7461-7466.

²⁵⁰ K. Inoue, S. Kuramitsu, A. Okamoto, K. Hirotsu, T. Higuchi, H. Kagamiyama, *Biochem.*, **1991**, 30, 7461-7466.

²⁵¹ P. Christen, *Biochem.*, **1994**, 33, 2757-2760.

²⁵² H. Hayashi, H. Kagamiyama, *Biochem.*, **1995**, 34, 9413-9423.

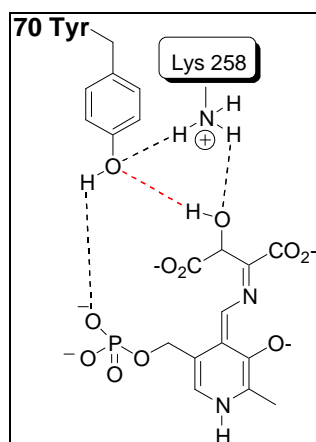


Figure 63 : stabilisation de l'intermédiaire quinonoïde formé avec le 3-β-hydroxyaspartate

De plus, une étude du mutant Tyr70-Ser⁴² a montré que le cycle aromatique de la Tyr70 est important pour la stabilisation des substrats comportant une chaîne à 5 carbones tels que le KG et le Glu.

En conclusion, la Tyr70 n'est pas indispensable à l'activité enzymatique de l'AspAT mais joue cependant un rôle non négligeable dans la stabilisation des intermédiaires réactionnels et en particulier pour les substrats à 5 carbones.

D. Le Tryptophane 140

Le Trp 140 est un résidu invariant des AspAT de diverses origines. Il a été décrit d'après des analyses cristallographiques, que ce résidu établit une interaction de type « stacking » avec le cycle pyridinique du coenzyme ainsi qu'une liaison hydrogène avec le groupement carboxylate ω du substrat (Figure 64).

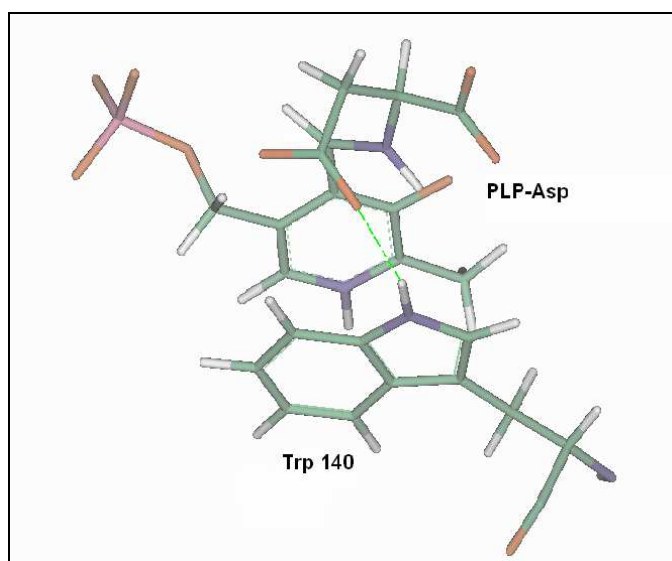


Figure 64 : Interaction entre le Trp140 et le ligand PLP-Asp de l'AspAT d'*E. coli* sous la forme aldimine externe (origine : fichier 1ARG de la PDB). Les pointillés représentent les liaisons hydrogènes.

Des mutants de l'AspAT d'*E.coli* ont été obtenus en remplaçant le Trp140 par la phénylalanine ou la glycine²⁵³. Les valeurs des paramètres cinétiques sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Substrat/enzyme	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ .s ⁻¹)
<u>OA</u>			
AspAT sauvage	0,035	800	23 10 ⁶
Trp140-Phe	2,8	210	75 000
Trp140-Gly	2,6	1,4	540
<u>α KG</u>			
AspAT sauvage	1,3	600	460 000
Trp140-Phe	22	130	6 000
Trp140-Gly	27	1,6	59
<u>Trp</u>			
AspAT sauvage	33	30	880
Trp140-Phe	40	2,5	63
Trp140-Gly	46	0,092	2
<u>Indolepyruvate</u>			
AspAT sauvage	3.0	54	18 000
Trp140-Phe	3.3	17	5 200
Trp140-Gly	2.6	1,1	420

Tableau 37

Le K_m des substrats dicarboxylés subit une forte augmentation lorsque le Trp est remplacé par la Gly ou la Phe. Ce n'est pas le cas pour les substrats monocarboxylés comme le tryptophane ou le cétoacide correspondant (indolepyruvate). Le tryptophane 140 renforce donc la stabilisation des substrats dicarboxylés en formant une liaison hydrogène supplémentaire avec le groupement carboxylate ω.

Quelque soit le substrat, l'activité catalytique diminue pour le mutant Trp140-Phe mais de façon beaucoup plus dramatique pour le mutant Trp140-Gly. Dans le cas du dernier mutant, il n'y a aucune stabilisation du cycle aromatique du coenzyme. Même si l'activité est meilleure pour le mutant Trp140-Phe, le cycle benzénique de la phénylalanine ne s'avère pas suffisant pour une stabilisation optimale du coenzyme. Des études cristallographiques²⁵⁴ laissent penser que pendant la transamination, le cycle pyridinique du coenzyme subit de

²⁵³ H. Hayashi, Y. Inoue, S. Kuramitsu, Y. Morino, H. Kagamiyama, *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, **1990**, 167, 407-412.

légères rotations qui seraient contrôlées par l'effet « staking » des interactions entre les deux cycles aromatiques du coenzyme et du Trp140.

La mutation du Trp140 en Histidine²⁵⁵ diminue l'activité de l'enzyme mais entraîne aussi une baisse de la stéréospecificité avec un taux de racémisation de l'alanine sept fois plus important. En l'absence d'interactions stacking, la reprotonation en α de l'intermédiaire quinonoïde peut se faire à la fois sur les faces *re* et *si*. (Figure 65)

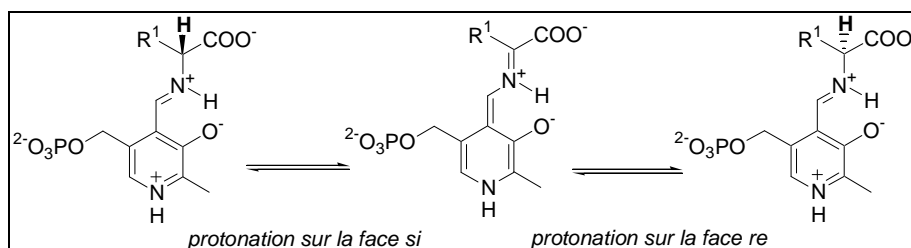


Figure 65 : racémisation de l'Ala dans le cas du mutant Trp140-His.

D'après ces études, on en déduit donc que le Trp 140 est un résidu essentiel à la fixation des substrats dicarboxylés et est indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme en régulant les mouvements de rotation du cycle du coenzyme et en participant à la stéréosélectivité de la réaction.

E. La Tyrosine 225

Des études cristallographiques ont montré l'existence d'une liaison hydrogène entre la Tyr225 et l'oxygène phénolique ($O^{3'}$) du coenzyme. Le tableau suivant présente le K_m et les paramètres cinétiques déterminés pour l'AspAT d'*E.coli* et les mutants Tyr 225-Phe^{256, 30} et Tyr 225-Arg²⁵⁷.

enzyme	k_{cat} (s^{-1})	Km (mM)		k_{cat}/K_m ($10^3 M^{-1}.s^{-1}$)	
		Asp	KG	Asp	KG
sauvage	220	2,0	0,6	110	370
Tyr225-Phe	0,60	0,43	0,14	1,4	4,3
Tyr225-Arg	1,2	0,83	0,36	1,4	3,3

Tableau 38 : étude de spécificité de substrats des mutants AspAT (Tyr225-Phe) et AspAT (Tyr225-Arg)

D'après ces études de mutagenèse dirigée, la Tyr 225 semble avoir très peu d'effet sur l'affinité pour les substrats dicarboxylés. Cependant ce résidu est bien nécessaire à l'activité

²⁵⁵ RA. Vacca, P. Christen, VN. Malashkevich, JN. Jansonius, E. Sandmeier, *Biochem*, **1995**, 227, 481-487.

²⁵⁶ J. M. Goldberg, R. V. Swanson, H. S. Goodman, J. F. Kirsch, *Biochem.*, **1991**, 30, 305-312.

²⁵⁷ K. Inoue, S. Kuramitsu, A. Okamoto, K. Hirotsu, T. Higuchi, Y. Morino, H. Kagamiyama, *J. Biochem.*, **1991**, 109, 570-576.

catalytique de l'enzyme puisque le k_{cat} de l'enzyme sauvage est 10^2 à 10^3 fois plus élevé que celui des mutants Tyr225-Arg et Tyr225-Phe.

La forme prédominante du complexe PLP-Lys258 chez l'AspAT sauvage et chez le mutant Tyr225-Arg est sous la forme **A** à pH physiologique (Figure 66). Par contre, en l'absence de liaison hydrogène (dans le cas du mutant Tyr225-Phe), la forme protonée **B** est dominante à pH physiologique et serait la moins réactive des deux formes.

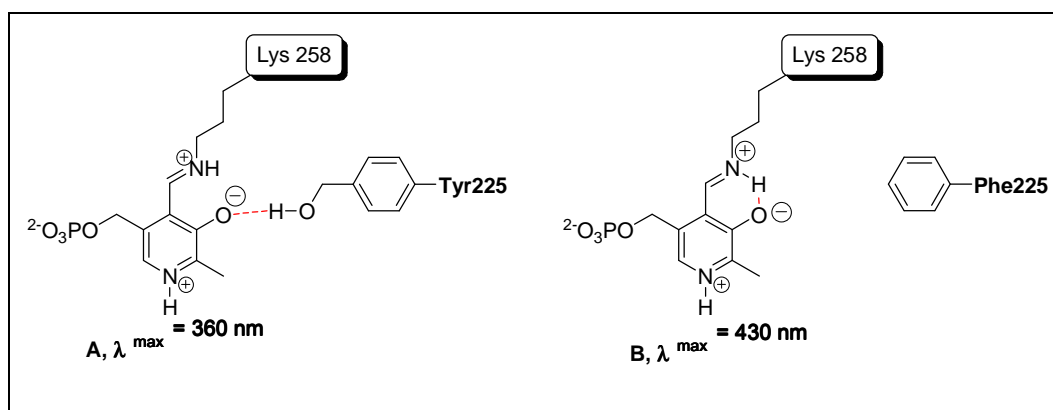


Figure 66 : comparaison du mutant Tyr225-Phe avec l'enzyme sauvage.

De plus, d'après une étude plus récente²⁵⁸, l'étape limitante dans le cas du mutant Tyr225-Phe serait l'hydrolyse de la cétimine. En effet, il semblerait que l'interaction du phénol de la Tyr avec le PLP augmente son caractère électrophile et aide à l'attaque d'une molécule d'eau suivant une orientation correcte pour l'hydrolyse.

Quant au mutant Tyr225-Arg, il est vrai que le groupe guanidinium de l'arginine forme une liaison hydrogène avec le O^{3'} et participe à l'abaissement du pKa de l'imminium de l'aldimine interne à pH physiologique. Cependant, on observe que ce mutant présente aussi de faibles k_{cat} par rapport à l'enzyme sauvage. Son interaction ionique est sans doute trop forte s'opposant à l'orientation optimale du complexe coenzyme-substrat lors des différentes étapes de la transamination.

En conclusion, la Tyr225 est essentielle à la catalyse enzymatique en contribuant à la répartition des charges électronique du complexe PLP-Lys258 et PLP-substrats.

F. L'Asparagine 194

Tout comme la Tyr225, l'Asn194 forme une liaison hydrogène avec le O^{3'} du PLP mais établit aussi des interactions de même nature avec l'Arg386 et le groupement carboxylate α des substrats (Figure 67).

²⁵⁸ L. Birolo, E. Sandmeier, P. Christen, R. A. John, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 232, 859-864.

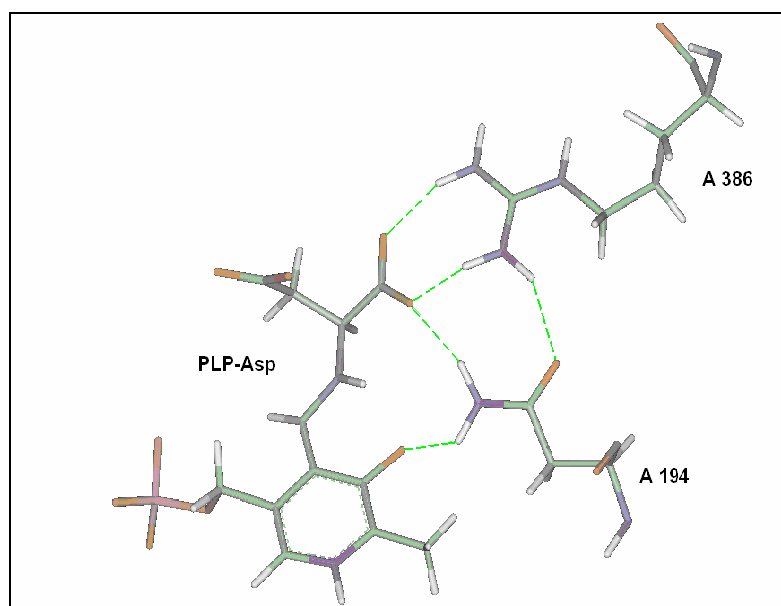


Figure 67 : Interaction entre l'Asn194 et le ligand coenzyme-Asp de l'AspAT d'*E. coli* sous la forme aldimine externe (origine : fichier 1ARG de la PDB). Les pointillés représentent les liaisons hydrogène.

Une mutation de l'Asn194 en alanine²⁵⁹ a été effectuée sur l'AspAT d'*E. coli* et une comparaison a pu être établie avec le mutant Tyr225-Phe et le double mutant Tyr225-Phe/Asn194-Ala. Le tableau ci-dessous expose les valeurs de K_d et k_{max} qui représentent les paramètres cinétiques des demi-réactions entre l'enzyme (sous la forme PLP ou PMP) et les substrats donneurs ou accepteurs.

$E + S \xrightleftharpoons{K_d} ES \xrightarrow{k_{max}} ES'$				
	Enzyme sauvage	Tyr225-Phe	Asn194-Ala	Tyr225-Phe/Asn194-Ala
k_{max} (s^{-1})				
Asp	550	2,6	200	0,069
Glu	700	15	140	0,22
OA	800	6,4	1000	3,4
KG	600	51	310	42
K_d (mM)				
Asp	4,5	0,083	63	58
Glu	38	12	330	140
OA	0,035	0,0062	2,0	0,69
KG	1,3	0,53	50	44

Tableau 39 : étude de spécificité de substrats des mutants AspAT (Tyr225-Phe), AspAT (Tyr225-Ala) et AspAT (Tyr225-Phe/ Asn194-Ala).

²⁵⁹ T. Yano, T. Mizuno, H. Kagamiyama, *Biochem.*, **1993**, 32, 1810-1815.

On remarque alors que les changements engendrés par les mutations au niveau des paramètres cinétiques sont inversés d'un mutant à l'autre : le remplacement de la Tyr225 entraîne une diminution du k_{\max} et une amélioration du K_d . Par contre, la mutation de l'Asn194 n'engendre que de faibles modifications des k_{\max} , mais entraîne une diminution de l'affinité des substrats dicarboxylés. Dans le cas du mutant Asn194-Ala, l'absence de liaison hydrogène avec le substrat diminue leur affinité. De plus, l'absence d'interaction entre l'Asn194 et l'Arg386 pourrait changer la conformation de l'arginine et indirectement perturber la fixation et l'orientation du substrat dicarboxylé. De plus, tout comme la Tyr225, l'Asn194 participe à l'abaissement du pKa de l'aldimine interne via la liaison hydrogène formée avec le O^{3'} du PLP. On en déduit donc que les interactions de l'Asn194 avec le substrat, le O^{3'} du PLP et l'Arg386 sont indispensables à stabilisation du coenzyme.

Le double mutant apporte une preuve de la complémentarité des rôles des deux résidus en position 194 et 225 : il présente à la fois une faible activité catalytique et une affinité médiocre envers les substrats amino et cétoacides.

En conclusion, l'Asn194 n'est pas essentiel à la catalyse enzymatique mais participe à la fixation des substrats dicarboxylés ainsi qu'à la stabilisation des complexes PLP-Lys258 et PLP-substrat.

G. L'Aspartate 222

L'Aspartate 222 est un résidu proche de l'azote pyridinique du coenzyme. Il est ainsi capable d'établir des interactions électrostatiques avec le coenzyme (Figure 68). Des études par mutagénèse dirigée²⁶⁰ ont montré son rôle essentiel dans la stabilisation de la forme pyridinium et en conséquence dans l'activité catalytique de l'enzyme.

²⁶⁰ T. Yano, S. Kuramitsu, S. Tanase, Y. Morino, H. Kagamiyama, *Biochem.*, **1992**, 31, 5878-5887.

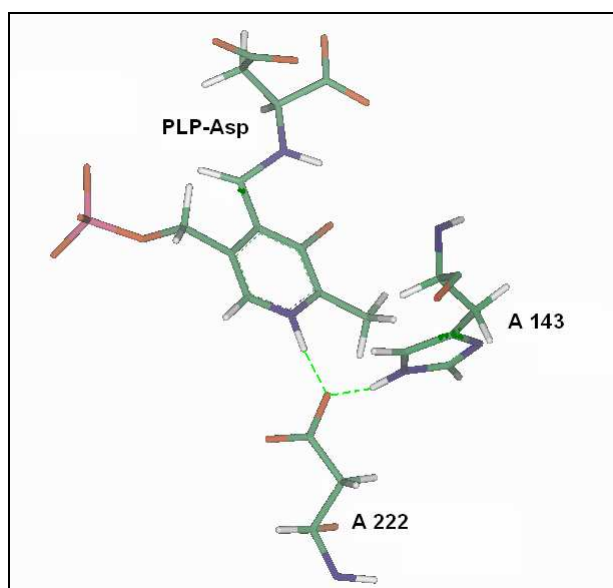


Figure 68 : Interactions de l'Asp222 et le reste du site actif de l'AsAT d'*E. coli* sous la forme aldimine externe (origine : fichier 1ARG de la PDB). Les pointillés représentent les liaisons hydrogène.

Le tableau suivant permet de comparer les paramètres cinétiques pour l'enzyme AspAT d'*E. coli* et les mutants Asp222-Glu, Asp222-Ala et Asp222-Asn.

	AspAT sauvage	Asp222-Glu	Asp222-Asn	Asp222-Ala
k_{cat} (s^{-1})				
Asp	210	61	0,073	0,041
K_m (mM)				
Asp	1,5	5	5,5	6,8
OA	0,45	0,17	3,9	3,4

Tableau 40 : étude de la spécificité de substrat des mutants AspAT (Asp222-Glu), AspAT (Asp222-Ala) et AspAT (Asp222-Asn).

Seule la substitution de l'Asp222 par le Glu permet de conserver les interactions ioniques et les liaisons hydrogènes avec le PLP. L'activité du mutant Asp222-Glu conserve une activité de l'ordre de 30 % de celle de l'enzyme sauvage. Par contre, les deux autres mutants ne possèdent qu'une très faible activité catalytique. L'affinité des substrats envers ces trois mutants est légèrement affaiblie. Ainsi, il apparaît que la charge négative portée par le résidu Asp222 est essentielle à l'activité catalytique de l'enzyme.

En effet, la stabilisation de la charge positive du cycle du PLP de l'aldimine externe est nécessaire pour la suite de la transamination. Le groupement carboxylate du résidu 222, de

part son interaction ionique avec le PLP, a un effet électro-attracteur favorisant l'arrachement du proton en α de l'acide (Figure 69).

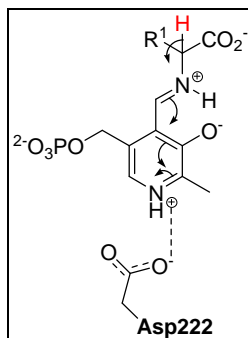


Figure 69 : stabilisation de l'aldimine externe par interaction avec l'Asp222

H. L'Histidine 143

Ce résidu interagit avec l'Asp 222, résidu étudié dans le paragraphe précédent (Figure 70).

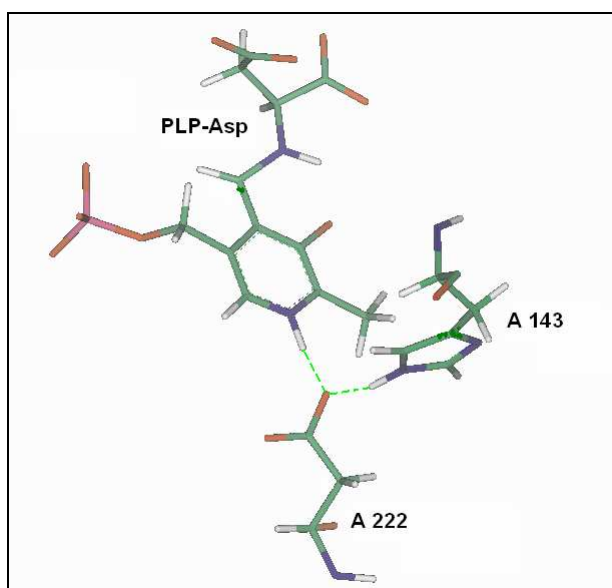


Figure 70 : Interactions de l'His143 avec le site actif de l'AspAT d'*E.coli* sous la forme aldimine externe (origine : fichier 1ARG de la PDB). Les pointillés représentent les liaisons hydrogène.

Des mutations de l'AspAT d'*E.coli* ont été effectuées pour déterminer l'importance des interactions de l'His143²⁶¹. Le tableau suivant expose les paramètres cinétiques de la réaction de transamination avec l'enzyme sauvage, et les mutants His143-Ala et His143-Asn.

²⁶¹ T. Yano, S. Kuramitsu, S. Tanase, Y. Morino, H. Kagamiyama, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 6079-6085.

Paramètres cinétiques	AspAT sauvage	Hist143-Asn	Hist143-Ala
k_{cat} (s^{-1})			
Asp	210	170	180
K_m (mM)			
Asp	1,5	32	23
Glu	18	140	170
OA	0,013	0,054	0,048
KG	0,45	1,6	1,4

Tableau 41 : étude de la spécificité de substrats des mutants AspAT (Hist143-Ala) et AspAT (Hist143-Asn).

Les K_m sont bien plus altérés par la mutation de l'His143 que ne le sont les constantes cinétique k_{cat} . L'His143 ne semble donc pas essentielle à la catalyse mais influence bien plus l'affinité des substrats dicarboxylés.

De plus, la fixation des inhibiteurs tels que le maléate ou le glutarate n'est pas modifiée par les mutations du résidu 143, alors que l'affinité du 3-méthylaspartate est bien plus faible que dans le cas de l'enzyme sauvage. Le 3-méthylaspartate est un inhibiteur qui conduit à la forme aldimine externe qui paraît donc moins stable dans le cas des deux mutants.

Par ailleurs, il a été remarqué que le pKa du PLP sous forme d'aldimine interne est plus élevé en l'absence d'His143. L'His143 participe donc, par l'intermédiaire de l'Asp222, à l'abaissement du pKa de l'aldimine interne facilitant ainsi la fixation des substrats.

II.4 Conclusion

Chaque résidu invariant du site actif de l'AspAT joue un rôle primordial dans l'ensemble de la réaction de transamination. Certains stabilisent l'aldimine interne pour une réaction optimale du substrat avec le coenzyme. D'autres résidus vont plutôt stabiliser et orienter au mieux le ligand coenzyme-substrat afin de conserver la stéréosélectivité et l'efficacité catalytique de la réaction de transamination. Le moindre changement structural du site actif entraîne des perturbations non négligeables de l'activité de l'enzyme. Pour une bonne activité de l'AspAT, il est donc important de conserver la structure du site actif obtenu avec les substrats naturels Asp/OA et Glu/KG.

Résultats et Discussion

Introduction

Comme nous l'avons évoqué précédemment, notre étude de modélisation moléculaire a eu pour objectif de comprendre et de mieux appréhender la spécificité de substrat de l'AspAT vis-à-vis des analogues du KG. En effet, de nombreuses données expérimentales ont été réunies ces dernières années et nous savons que l'AspAT d'*E.coli* offre la particularité d'accepter des analogues du KG substitués en position 4 par des groupements hydrophobes, parfois volumineux et comportant de longues chaînes. De plus, cette enzyme montre une énantiosélectivité marquée en faveur d'un des deux énantiomères des analogues du KG substitués en position 4. Dans cette étude, nous avons également cherché à établir un modèle de prédiction d'activité de l'AspAT en déterminant les critères structuraux nous permettant de révéler la qualité de substrat pour l'enzyme.

De nombreuses structures cristallines de l'AspAT d'*E.coli* sont répertoriées dans la PDB. Les structures correspondent à des formes fermées ou ouvertes. Plusieurs complexes présentent le coenzyme et le substrat ou des analogues dicarbonylés à l'intérieur du site actif. Ces dérivés sont soit non liés soit correspondant à un intermédiaire réactionnel. Différentes approches s'offrent donc à nous pour appréhender cette étude de modélisation.

Nous avons choisi de travailler sur un des intermédiaires réactionnels. Le premier a été l'intermédiaire aldimine externe dans lequel le substrat est lié de façon covalente au coenzyme, dans le site actif de l'enzyme présentant une conformation fermée. En effet, nous avons estimé que la nature covalente du lien entre le substrat et le coenzyme permettrait de réduire les degrés de liberté du système et ainsi d'obtenir des résultats plus fiables. De plus, l'existence de la structure 1ARG correspondant à l'intermédiaire aldimine formé entre l'AspAT d'*E.coli* et l'OA constitue un excellent point de départ pour notre étude. Enfin, l'interconversion aldimine-cétimine constitue l'étape limitante du processus de transamination et la stabilisation de l'intermédiaire aldimine est vraisemblablement représentative de l'efficacité catalytique de l'AspAT.

Notons que pour alléger la notation des complexes AspAT-PLP-substrat, nous utiliserons les formules suivantes Ald-substrat ou Cet-substrat indiquant que la nature de l'intermédiaire réactionnel et celle du substrat cétonique mis en jeu. De plus, il est important de souligner que le premier intermédiaire formé à partir du KG ou de ses analogues, est l'intermédiaire cétimine et non l'aldimine externe. Cependant, l'intermédiaire aldimine se forme à l'étape suivante et il nous a donc paru justifié de rechercher une corrélation entre la

qualité du substrat déterminé expérimentalement avec les analogues du KG (kcat et Km) et les paramètres structuraux de l'intermédiaire aldimine.

Dans un premier temps, nous avons construit un modèle de référence correspondant au complexe Ald-KG à partir de la structure 1ARG correspondant au complexe Ald-OA²¹. A partir de ce modèle de référence où le PLP est lié de façon covalente au KG sous la forme de l'intermédiaire aldimine externe, nous avons construit différents complexes Ald-substrat en ajoutant les groupements méthyle et benzyle en position 4*R* et 4*S*.

Nous avons par la suite réalisé la construction progressive de nouveaux modèles pour des substrats présentant des chaînes de plus en plus longues. Dans le cas de substrats à longues chaînes, un des objectifs a été de savoir si les analogues du KG immobilisés peuvent être d'éventuels substrats de l'AspAT.

Enfin, lors des derniers mois de cette thèse, nous avons effectué une étude de modélisation portant sur un autre intermédiaire réactionnel de la transamination : l'intermédiaire cétimine, dans le but d'améliorer notre modèle de prédiction d'activité de l'AspAT.

Démarche adoptée pour l'étude de Docking

La démarche adoptée pour l'étude conformationnelle de chacun des complexes enzyme-PLP-KG et analogues du KG a été la suivante :

1) Une minimisation de l'énergie du ligand coenzyme-substrat isolé de l'enzyme a été réalisée à l'aide du logiciel Ampac8²⁶² en utilisant la méthode AM1²⁶³. Ce premier calcul nous a permis de déterminer les charges partielles de chaque atome du ligand en prenant en compte la délocalisation des électrons au sein du système conjugué de l'intermédiaire aldimine. Dans ce cas, le calcul est effectué en phase gaz dans laquelle des molécules d'eau ont été ajoutées afin de stabiliser les charges du ligand. L'ajout de ces molécules d'eau a permis de mimer les interactions existantes entre le ligand et les résidus du site actif de manière à maintenir la géométrie du ligand PLP-substrat existante initialement dans le site actif de l'enzyme.

²⁶² Ampac8.0, © 2006 Semichem, 7128 Summit, Shawnee, KS 66216, USA.

²⁶³ Michael J. S. Dewar, Eve G. Zoebisch, Eamonn F. Healy, James J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 3902-3909

2) Après modification structurale des ligands coenzyme-substrat à l'intérieur du site actif, l'énergie des complexes enzyme-PLP-substrat a été minimisée en utilisant la méthode du gradient conjugué à l'aide du logiciel Discover (interface graphique InsightII)²⁶⁴ et du champ de force CFF91. Les temps de calcul étant raisonnables (quelques heures à 24h sur deux processeurs), la minimisation a pu être effectuée localement au laboratoire.

3) Comme nous l'avons évoqué précédemment, la minimisation d'énergie n'assure pas l'obtention de la conformation la plus stable. Nous avons donc effectué pour chacun des complexes étudiés, un recuit simulé en DM avec une température initiale de 340 K et en l'abaissant ensuite à 298 K avec un pas d'intégration de 1 femtoseconde et sur une durée totale de 7 nanosecondes. Parmi les structures générées au cours de la DM effectuée à 298 K, 100 ont été sauvegardées et leurs énergies ont été ensuite minimisées. La conformation de plus basse énergie ainsi obtenue a alors été considérée comme étant la plus stable. Cette étape a nécessité une approximation : un calcul de recuit simulé sur la totalité de l'enzyme représente un temps de calcul trop conséquent, c'est pourquoi nous avons choisi de geler les résidus qui sont à une distance supérieure à 8 Å du carbone de l'imine du ligand et ceci sur les deux sites actifs de l'enzyme. Les calculs de recuit simulé en DM ont été réalisés sur les super calculateurs Silicon Graphics du CINES (8 processeurs).

²⁶⁴ Accelrys, release 2000.1, San Diego CA.

Chapitre I Etude de l'intermédiaire aldimine externe

I.1 Construction du modèle de référence : complexe AspAT-KG

Comme les structures RX disponibles dans la PDB ne se composent que d'atomes lourds où les protons restent absents, nous avons, à l'aide d'Insight II Discover et en utilisant le champ de force CFF91, complété la structure 1ARG²²⁹ qui correspond au complexe Ald-OA et minimisé son énergie. La figure suivante représente la structure du site actif de l'enzyme où les liaisons hydrogène formées entre les résidus sont en pointillés. Le complexe PLP-OA est en code couleur atomique (blanc : hydrogène, vert : carbone, rouge : oxygène, bleu : azote, phosphore : parme) alors que les acides aminés du site actif sont de couleur bleu. La Lys258 est sous sa forme non-protonée contrairement aux autres résidus Lys de l'enzyme. En effet, à cette étape de la réaction de transamination, il est important que la Lys258 soit sous cette forme afin de catalyser l'équilibre aldimine-cétimine.

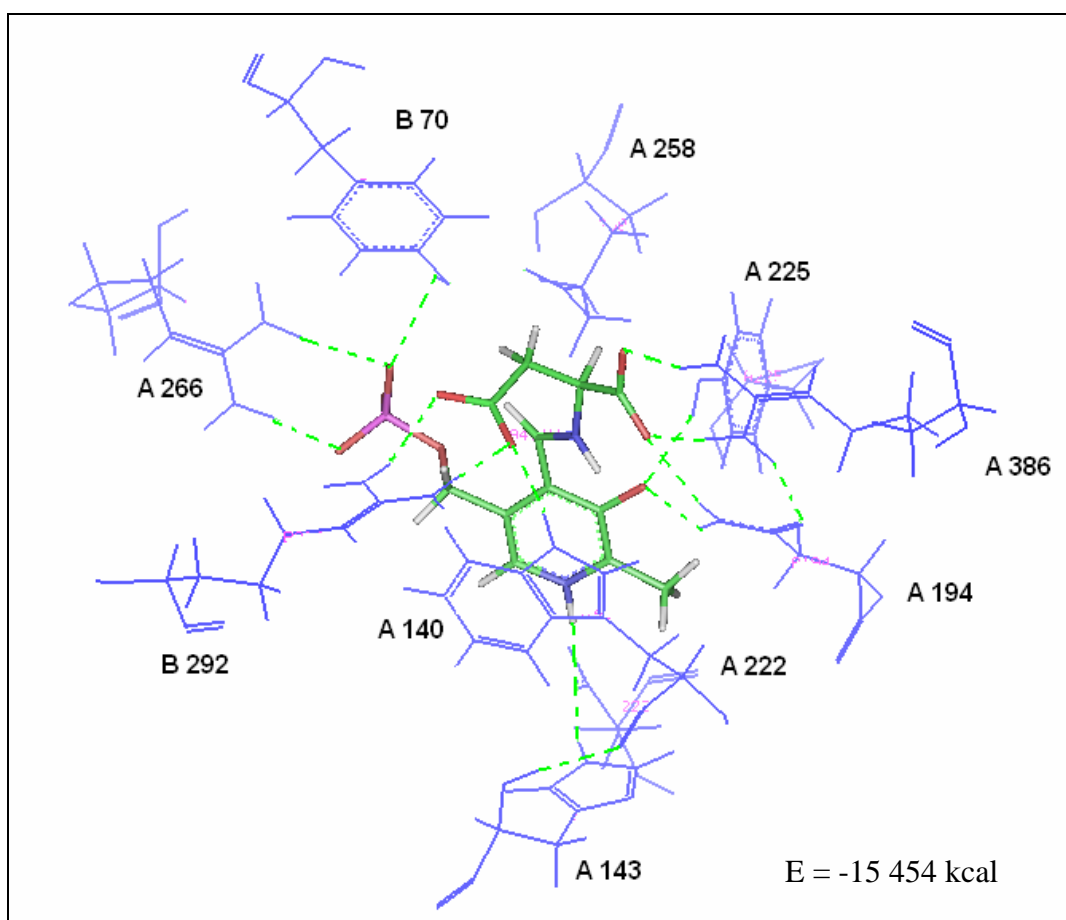


Figure 71 : Vue des interactions entre le site actif de l'AspAT et le substrat du complexe Ald-OA.

Notons que la désignation A indique que l'acide aminé appartient à la chaîne A, une des sous-unités de l'AspAT, et que la lettre B montre donc que le résidu fait partie de la chaîne B, l'autre sous-unité de l'enzyme.

Nous avons vérifié à ce stade que les interactions essentielles à la catalyse enzymatique sont conservées : La Tyr **B70** forme via son groupement phénol une liaison hydrogène avec un oxygène du groupement phosphate du PLP. Le Trp **A140** stabilise le PLP par « stacking » entre les deux cycles aromatiques. Il intervient également en formant une liaison hydrogène par son groupement amide (NH) et le groupement carboxylate α du substrat. La Tyr **A225** établit une liaison hydrogène avec le groupement phénol du PLP. L'Asp **A222** forme une liaison hydrogène entre son groupement carboxylate et le groupement pyridinium du PLP. L'Hist **A143** se distingue par sa liaison hydrogène avec l'Asp 222. L'Arg **A266** forme deux liaisons hydrogène avec le groupement phosphate du PLP. Les Arg **B292** et **A386** jouent un rôle important dans la fixation du substrat en formant un pont salin entre leur groupement guanidinium et les groupements carboxylate portés par le substrat. Contrairement aux autres complexes étudiés par la suite, nous n'avons pas jugé utile d'effectuer un recuit simulé par DM pour cette structure initiale.

Après substitution de l'OA par le KG (ajout d'un CH_2), nous avons effectué l'enchaînement de DM et de minimisation d'énergie décrits précédemment. Les interactions nécessaires à la catalyse citées précédemment ont été conservées (Figure 72). Ce résultat peut être considéré comme une validation du modèle puisque le KG est un substrat naturel de l'AspAT. La coplanarité entre le groupement carboxylate γ et l'Arg292 est moins bonne que dans le cas du complexe Ald-OA puisqu'elle subit une déviation de 40° environ. Cela est dû à l'allongement de la chaîne qui crée une contrainte l'obligeant à pivoter. Ce phénomène, également évoqué dans la littérature, pourrait expliquer l'affinité plus faible des substrats à 5 carbones (par ex : KG, $K_m = 0,23 \text{ mM}$) par rapport aux substrats à 4 carbones (par ex : OA, $K_m = 0,01$) envers l'AspAT²²⁸.

De plus, le plan de l'imine du PLP et celui du cycle pyridinium ne sont pas coplanaires. En effet, nous mesurons une déviation de 50° . Il est vrai que l'on pouvait s'attendre à avoir un angle proche de 0° en raison de la conjugaison entre l'imine et le cycle pyridinium. Afin de conserver une structure similaire, nous aurions pu imposer une contrainte au niveau de cet angle dièdre afin qu'il reste égal à 0° . Cette stratégie a été adoptée lors de la construction de l'intermédiaire quinonoïde à partir du complexe 1ARG (qui est un système entièrement conjugué) pour maintenir la structure du ligand plane²²⁹. Il se pourrait alors que le

champ de force CFF91 ne soit pas suffisamment précis pour rendre compte de l'ordre exacte des liaisons et des conjugaisons qui existent entre elles.

De plus, il est intéressant de noter que nous n'avons pas non plus observé de coplanarité dans la structure cristalline initiale 1ARG où la déviation entre les plans de l'imine et du cycle du PLP est de 28° . Nous avons donc décidé de poursuivre notre étude avec ce modèle qui nous a servi de **modèle de référence** et qui est représenté en rouge dans les figures suivantes.

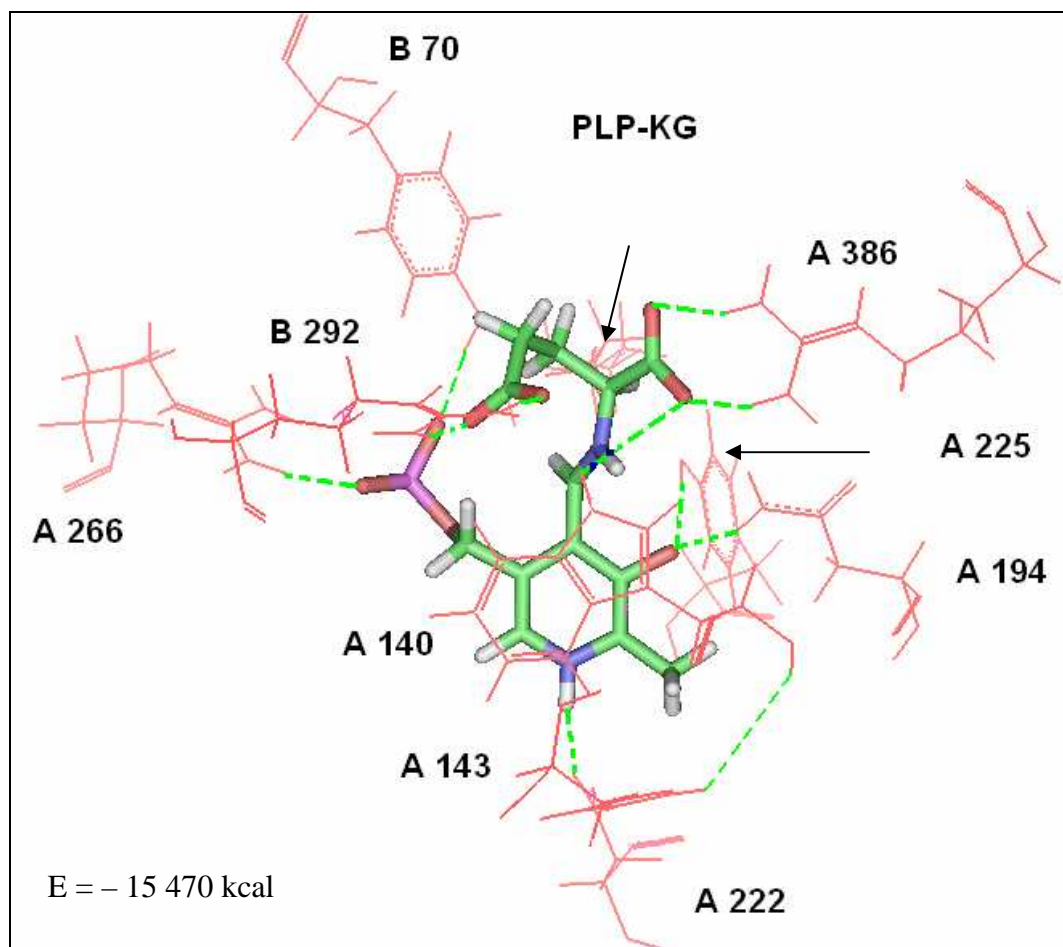


Figure 72 : structure du site actif du complexe Ald-KG.

1.2 Etude de l'énantiosélectivité de l'AspAT

1.2.1 Construction des complexes Ald-(4-Me-KG)

Nous avons ajouté un groupement méthyle en substituant l'atome d'hydrogène pro*R* ou pro*S* en position 4 du KG dans le modèle de référence. Après DM, dans les deux cas, les interactions essentielles à la catalyse sont conservées. Les structures des sites actifs obtenues

ont été superposées avec celle du modèle de référence afin de comparer les modifications causées par l'introduction d'un groupement méthyle en position 4 du KG (Figure 73).

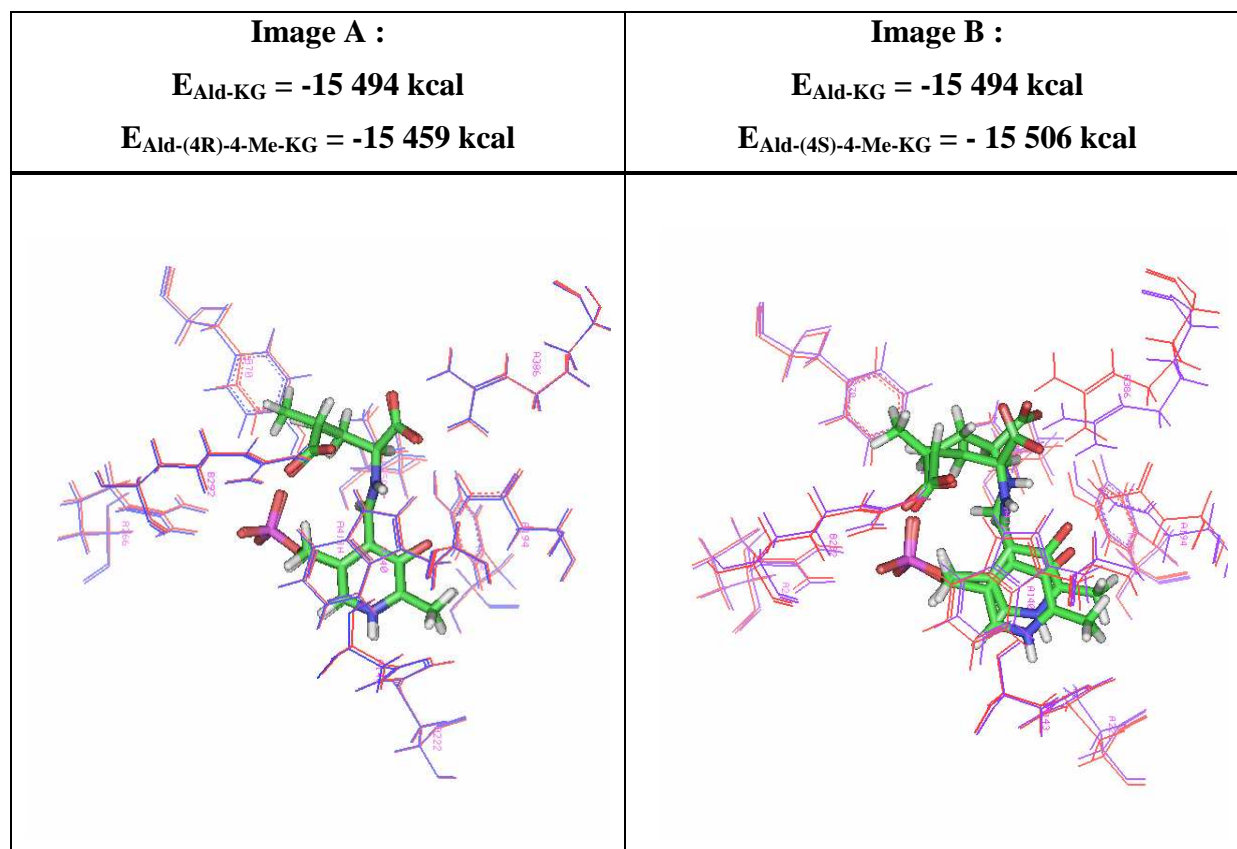


Figure 73 : image A : superposition de la structure du site actif du complexe Ald-(4R)-4-Me-KG (en bleu) avec le modèle de référence (en rouge) ; image B : superposition de la structure du site actif du complexe Ald-(4S)-4-Me-KG (en bleu) avec le modèle de référence (en rouge).

L'écart des énergies des complexes Ald-(4R)-4-Me-KG et Ald-(4S)-4-Me-KG n'est pas significatif car il représente que 0,3 % de l'énergie globale de l'enzyme.

La figure A montre une très bonne superposition du complexe Ald-KG et celui de l'Ald-(4R)-4-Me-KG. Nous remarquons donc que l'ajout d'un groupement méthyle en position 4R du KG entraîne très peu de modifications dans l'arrangement spatial des acides aminés essentiels à la catalyse enzymatique. De même, les ligands PLP-substrat sont parfaitement superposables. Ce qui est en accord avec les données expérimentales indiquant que le (4R)-4-Me-KG est un très bon substrat de l'AspAT d'*E.coli*.

La figure B est la superposition du modèle obtenu avec l'énantiomère S du 4-Me-KG et du modèle de référence. Dans ce cas, nous observons une modification importante de l'arrangement spatial des résidus du site actif et du ligand PLP-substrat. En effet, l'ajout d'un groupement méthyle en position 4S entraîne un décalage des acides aminés et du substrat par rapport aux positions qu'ils occupent dans le complexe AspAT-KG. La chaîne carbonée du

KG a pivoté pour se stabiliser dans le site actif. Ces perturbations sont sans nul doute, liées à la faible activité de l'AspAT pour cet analogue.

Nous en déduisons que même si la structure obtenue avec l'énantiomère 4*S* paraît plus stable d'un point de vue énergétique que celle de l'énantiomère 4*R*, elle n'est vraisemblablement pas favorable à la réaction de transamination. En fait, seule la comparaison structurale au modèle de référence paraît instructive.

Cette étude de modélisation des complexes AspAT-4-Me-KG permet donc d'expliquer l'énantiosélectivité de l'AspAT.

I.2.2 Construction des complexes AspAT-(4-Bn-KG)

Nous avons poursuivi notre étude avec un autre substrat substitué en 4 par un groupement plus volumineux. Nous avons choisi le dérivé 4-Bn-KG pour lequel une très bonne activité a été mise en évidence ainsi qu'une énantiosélectivité très marquée en faveur de l'isomère de configuration 4*R*. En partant du complexe Ald-(4*R*)-4-Me-KG, nous avons tout d'abord construit trois modèles qui correspondent aux différentes possibilités de substitution d'un des hydrogènes du groupement méthyle par le noyau phényle. L'énergie de ces structures a été minimisée avant leur superposition au modèle de référence (Figure 74).

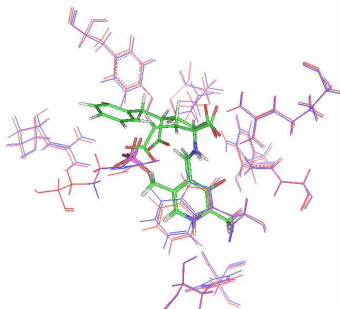
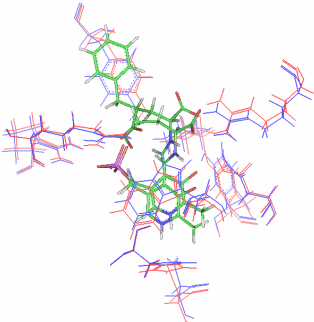
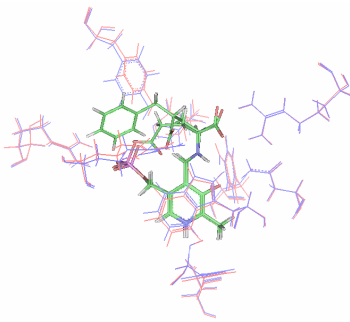
Image A $E_{\text{Ald-4-Bn-KG}} = -15\,472 \text{ kcal}$	Image B $E_{\text{Ald-4-Bn-KG}} = -15\,468 \text{ kcal}$	Image C $E_{\text{Ald-4-Bn-KG}} = -15\,463 \text{ kcal}$
		

Figure 74 : superpositions des complexes Ald-(4*R*)-4-Bn-KG avec le modèle de référence.

Une seule position permet d'introduire le groupement phényle sans entrainer d'importantes perturbations au niveau du site actif et du complexe PLP-substrat (image A, figure). De plus cette structure est celle qui présente l'énergie la plus basse. Elle a donc fait

l'objet d'un calcul plus approfondi en DM (recuit simulé) afin d'obtenir la conformation la plus probable.

Dans le cas du (4*S*)-4-Bn-KG, nous avons introduit le groupement phényle sur l'analogue (4*S*)-4-Me-KG de façon à minimiser les interactions stériques avec les autres résidus du site actif.

En superposant les structures obtenues à celle de référence (Figure 75), nous pouvons faire le même type d'observations que dans le cas des analogues 4-Me-KG.

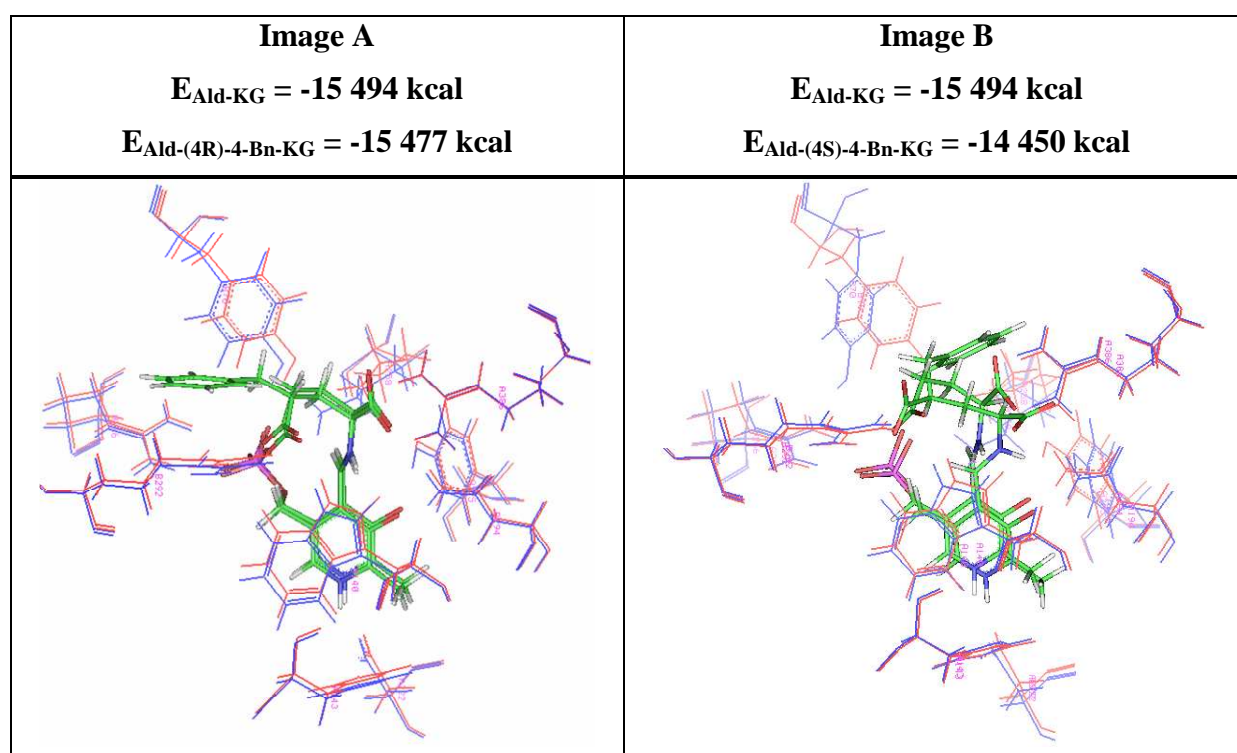


Figure 75 : image A : superposition de la structure du site actif du complexe Ald-(4*R*)-4-Bn-KG (en bleu) avec le modèle de référence (en rouge) ; image B : superposition de la structure du site actif du complexe Ald-4*S*-Bn-KG (en bleu) avec le modèle de référence (en rouge).

Par comparaison des énergies des structures obtenue après DM, il est clair que la structure obtenue avec le (4*S*)-4-Bn-KG est beaucoup moins stable que celle obtenue avec l'énantiomère *R*. En effet, nous mesurons un écart de 1 000 kcal entre les énergies des 2 complexes.

L'introduction d'un groupement volumineux en position 4*R* dans le site actif de l'AspAT, perturbe très peu le positionnement des atomes observé dans le modèle de référence (figure A). Ce qui valide notre modèle sachant que le (4*R*)-4-benzyl-KG est un très bon substrat (cf partie I).

Par contre, dans le cas de l'énantiomère *S*, comme dans le cas du (4*S*)-4-Méthyl-KG, nous observons d'importantes modifications structurales à l'intérieur du site actif : la chaîne du KG a subi une rotation pour se stabiliser (figure B). Un des groupements carboxylate de la chaîne glutamate a sévèrement pivoté perdant une liaison hydrogène avec l'Arg386. De plus, les acides aminés essentiels à la catalyse tels que la Tyr70 et la Lys258 se sont décalés comme le montre la figure de gauche. Ces observations sont en accord avec l'énantiosélectivité très marquée de l'AspAT vis-à-vis de cet analogue.

I.2.3 Optimisation du temps de calcul de la DM

Les recuits simulés des complexes Ald-KG, 4-Me-KG et 4-Bn-KG ont été réalisés en appliquant la DM sur un ensemble de résidus se situant dans une sphère de rayon 8 Å (subset de 8 Å) autour du ligand, et ce, pour les deux sites actifs de l'enzyme (Figure 76, image A) alors que le reste de la protéine est maintenu fixe. Il est à noter que des structures quasiment superposables ont été obtenues pour les 2 sites actifs.

Il est important de souligner qu'un recuit simulé de 1ns nécessite une durée de 1 mois de calcul sur les 2 processeurs disponibles au laboratoire et que pour l'étude de modélisation des complexes AspAT-substrats, nous ne disposons que d'un nombre d'heures limitées sur les processeurs du CINES. C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant d'essayer d'optimiser le temps de calcul en limitant le calcul de DM aux atomes des résidus d'un seul site actif, le reste des atomes du complexe moléculaire étant maintenu fixe.

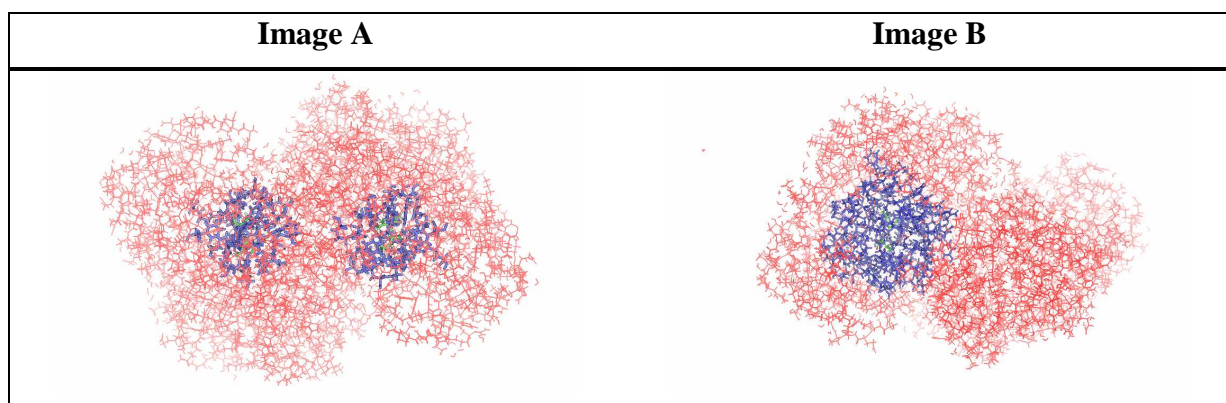


Figure 76 : image A : complexe Ald-KG où les subsets de 8 Å pour chaque site actif de l'enzyme sont représentés en bleu. **Image B :** complexe Ald-KG où le subset de 13 Å pour un seul site actif de l'enzyme est représenté en bleu.

Dans le cas du complexe Ald-KG, la durée du calcul de DM est d'environ 57h en travaillant sur les 8 processeurs du CINES (Tableau 42).

Nombre de sites actifs	Subset (Å)	Durée de la DM (h)	Energie de la structure la plus stable (Kcal)
2	8	57	- 15 477
1	8	33	- 15 476
1	13	58	- 15 490

Tableau 42 : comparaison de la durée de la DM en faisant varier la grandeur du subset et le nombre de sites actifs du complexe Ald-KG

Nous avons effectué un premier essai de DM sur un subset de 8 Å portant uniquement sur l'un des deux sites actifs du complexe Ald-KG. Le temps de calcul est réduit à 33h. Cependant, même si son énergie est similaire à celle du complexe obtenue en effectuant la DM sur les 2 sites actifs, la structure de plus basse énergie ne correspond pas à celle de référence. En effet la Lys258 s'est éloignée de 2 Å. Nous avons fait la même constatation en prenant un subset de 10 Å.

En revanche, avec un subset plus important de 13 Å (Figure 76, image B), nous obtenons une structure du site actif du complexe Ald-KG très similaire à celle de référence obtenue précédemment et qui présente une énergie légèrement plus basse. Mais dans ce cas, la durée de la DM reste malheureusement du même ordre de grandeur que celle qui comprend les deux sites actifs (58h).

Par la suite, nous avons adopté cette stratégie qui réduit la manipulation à un seul site actif et offre un subset plus élargi pour la DM.

1.3 Modèle de prédiction d'activité

Afin d'établir un modèle de prédiction d'activité, nous avons recherché des critères plus quantitatifs révélant la qualité du substrat vis-à-vis de l'enzyme.

1.3.1 Recherche de critères quantitatifs

Il est clair que la comparaison des énergies correspondant aux différents modèles ne nous permet pas de prédire l'activité de l'enzyme vis-à-vis des analogues du Glu étudiés. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, la structure obtenue dans le cas du (4S)-4-Me-KG présentant une énergie plus basse (ou du même ordre de grandeur) que celle du

modèle obtenu avec l'énantiomère *4R*, n'est vraisemblablement pas favorable au bon déroulement de la transamination.

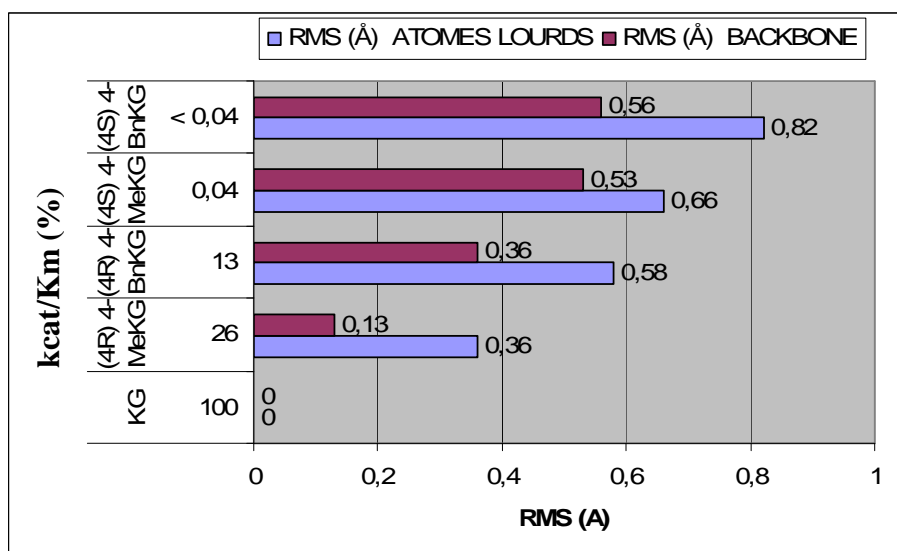
Cependant, nous pouvons quantifier les modifications structurales du site actif par rapport à la structure de référence par la mesure du coefficient RMS (Root Mean Square : écart quadratique moyen).

Le coefficient RMS rend compte de la déviation moyenne qui existe entre les positions atomiques de deux molécules superposées. On peut donc dire que plus le RMS est petit, plus la superposition de deux molécules est bonne. Le tableau ci-après présente les valeurs du RMS calculé lors de la superposition des atomes lourds et du backbone des complexes Ald-substrats.

analogues de Glu étudiés	kcat/Km (%)	RMS (Å)	RMS (Å)
		Atomes lourds	Backbone
KG	100	0	0
(4 <i>R</i>)-4-Me-KG	26	0,36	0,13
(4 <i>R</i>)-4-Bn-KG	13	0,58	0,36
(4 <i>S</i>)-4-Me-KG	0,04	0,66	0,53
(4 <i>S</i>)-4-Bn-KG	< 0,04	0,82	0,56

Tableau 43 : comparaison des coefficients RMS.

Comme cela apparaît qualitativement dans les superpositions, ce coefficient semble un indicateur sensible de la qualité de substrat. En effet, le (4*R*)-4-Me-KG est meilleur substrat que le (4*R*)-4-Bn-KG, et les coefficients RMS obtenus dans le cas du (4*R*)-4-Me-KG sont inférieurs à ceux du (4*R*)-4-Bn-KG. De même, il est vérifié que plus le rapport kcat/Km diminue, plus les RMS augmentent (Graphique 1). Nous observons donc une certaine corrélation entre les paramètres cinétiques et le RMS. Dans la suite de notre étude, tous les RMS donnés seront par défaut calculés à partir de la superposition des atomes lourds des complexes qui, contrairement au RMS du backbone, prennent bien en compte la déviation moyenne des chaînes latérales.



Graphique 1 : comparaison des RMS avec les rapports kcat/Km des substrats de l'AspAT d'*E.coli*.

Nous nous sommes également intéressés à la mesure des angles dièdres autour de la fonction imminium formé entre le KG (ou un analogue) et le coenzyme. En effet, au cours de la catalyse, l'intermédiaire subit une déprotonation au niveau du carbone α assuré par la Lys 258, qui est rendue possible par la délocalisation électronique vers l'imminium, lui-même conjugué avec le cycle pyridinium. La valeur des angles dièdres θ_1 et θ_2 représentés dans la figure ci-dessous, est donc vraisemblablement un facteur déterminant pour cette étape de la catalyse qui est par ailleurs l'étape déterminante du processus de transamination.

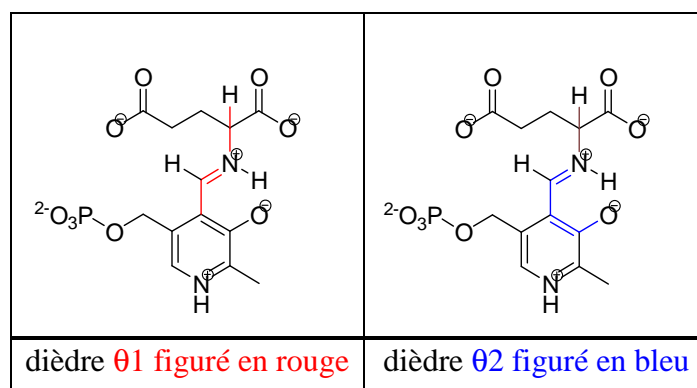


Figure 77 : description des dièdres θ_1 et θ_2 .

L'angle dièdre θ_1 rend compte de l'orientation de la liaison C-H (qui sera rompu) par rapport au plan de l'imminium. Un angle proche de 90° (en valeur absolue) serait optimal pour une déprotonation concertée à la délocalisation du doublet électronique. De plus, l'imine et le cycle du pyridoxal phosphate devraient être dans le même plan à cause de la stabilisation par mésomérie, d'où un θ_2 idéal proche de 0° . Cependant les modèles correspondants à ces

intermédiaires stables sont susceptibles de s'écarter des états de transition de l'étape de déprotonation.

Le tableau suivant permet de comparer les valeurs de θ à celles du modèle de référence.

Substrats étudiés	θ_1 (°)	θ_2 (°)
KG	-52,6	-57,23
4R Me KG	-51,8	-48,91
4S Me KG	-24,6	-39,06
4R Bn KG	-52,2	-52,71
4S Bn KG	-136,4	+44,07

Tableau 44 : comparaison des dièdres pour chaque substrat de l'AspAT d'*E.coli*.

On observe que θ_1 est égal à environ -52° dans le cas du modèle de référence et que cette valeur se repète pour les 2 analogues de configuration 4R pour lesquels une bonne activité enzymatique est mesurée. Alors que pour les analogues de configuration S qui sont de mauvais substrats, les valeurs du dièdre sont très éloignées de -52° . Ce qui correspond bien au fait que les énantiomères 4S se positionnent mal dans le site actif et tendent à affaiblir l'activité enzymatique. Pour θ_2 , la différence est moins significative.

La mesure de l'angle dièdre θ_1 semble être un bon critère pour estimer l'activité de l'enzyme envers les analogues du Glu.

Nous avons également mesuré la distance entre l'azote de la Lys258 et le H porté par le carbone α (tableau). Dans ce cas, nous n'avons pas observé de corrélation avec l'activité enzymatique. En effet, la distance entre la Lys258 et le H^α est proche de 2,6 Å dans le cas des complexes Ald-KG et Ald-4-Me-KG, alors qu'on mesure une distance d'environ 4 Å dans le cas des complexes Ald-4-Bn-KG.

Substrat étudié	KG	(4R)-4-Me-KG	(4S)-4-Me-KG	(4R)-4-Bn-KG	(4S)-4-Bn-KG
Kcat/Km (%)	100	26	0,04	13	< 0,04
Distance Lys258- H^α (Å)	2,65	2,63	2,34	4,14	4,09

Tableau 45 : comparaison de la distance Lys258- H^α et les paramètres cinétiques des analogues du KG.

I.3.2 Limites du modèle

Nous avons par la suite construit un modèle avec l'analogue 4-carboxyméthyl-KG **33d** de même configuration relative que le (4*R*)-4-Bn-KG. D'après les paramètres cinétiques, le composé **33d** est un mauvais substrat de l'AspAT tout comme les autres analogues du KG substitués par des groupements hydrophiles. La construction du complexe a été effectuée à partir du modèle réalisée avec le (4*R*)-4-Bn-KG pour orienter convenablement le groupement carboxylate (Figure 78). Ce groupement peut être soit sous sa forme protonée, soit anionique. Nous avons donc jugé qu'à pH = 7, la forme anionique était la plus probable.

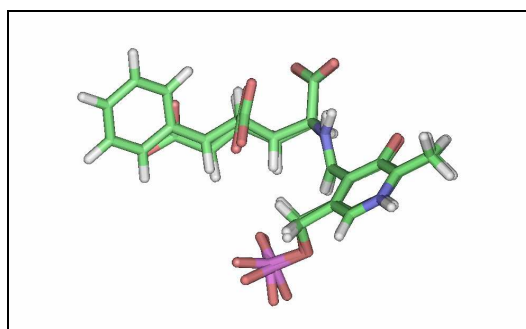


Figure 78 : construction du ligand PLP-(4*S*)-4-carboxyméthyl-KG à partir du PLP-(4*R*)-4-Bn-KG.

En superposant le complexe Ald-**33** avec le modèle de référence, nous observons très peu de modifications structurales au niveau du site actif (Figure 79).

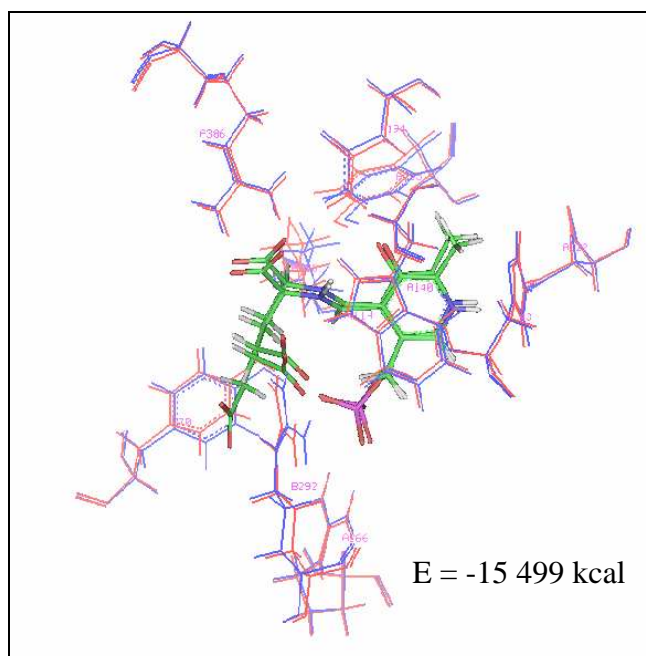


Figure 79 : superposition de la structure du site actif du complexe Ald-(4*R*)-4-carboxyméthyl-KG (en bleu) avec le modèle de référence (en rouge).

De même, les valeurs des dièdres θ_1 et θ_2 , présentées dans le tableau ci-dessous, sont proches des valeurs du modèle de référence.

Substrats étudiés	kcat/Km (%)	$\theta 1$ (°)	$\theta 2$ (°)	RMS (Å)	RMS (Å)
				Atomes lourds	Backbone
KG	100	-52,6	-57,23	0	0
33d	< 0,001	-55,84	-46,94	0,51	0.25

Tableau 46 : comparaison des critères de qualité de substrat avec l'activité de l'AspAT.

Ce dernier cas met en évidence les limites de notre modèle car le complexe AspAT-substrat construit avec le 4-carboxyméthyl-KG satisfait aux critères du modèle de prédiction d'affinité alors que cet analogue constitue un très mauvais substrat de l'enzyme.

En construisant nos modèles d'intermédiaires aldimine, nous supposons que le substrat s'est introduit dans le site actif de l'enzyme. L'entrée d'un substrat dans le site actif de l'enzyme nécessite une étape de désolvatation, ce qui demande une énergie plus importante dans le cas d'un analogue substitué par un groupement polaire (Figure 80).

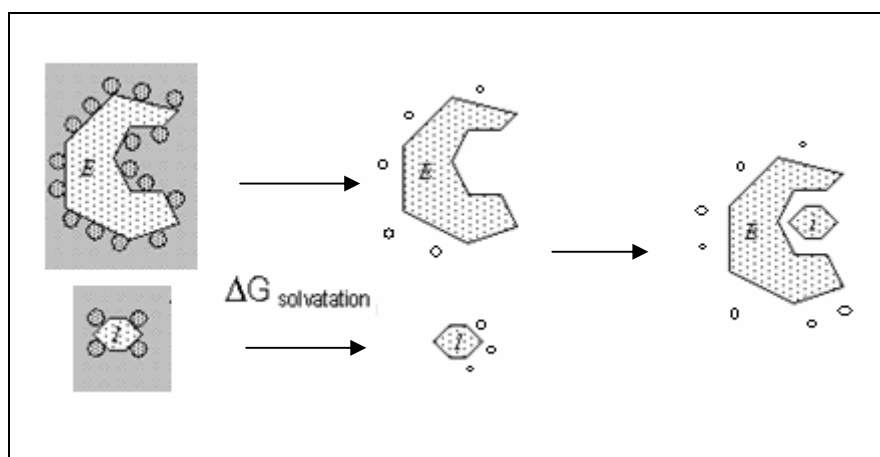


Figure 80 : désolvatation nécessaire pour former le complexe enzyme-substrat

Nous avons donc calculé l'énergie de solvation ($\Delta G_{\text{solvation}}$) pour chacun des analogues du KG jusqu'ici étudiés (Tableau 47). Les calculs des enthalpies G_{gaz} et $G_{\text{H}_2\text{O}}$ ont été réalisés respectivement en phase gaz et dans l'eau à l'aide du logiciel Ampac8.0 en utilisant la méthode de solvation sm5.2R²⁶⁵.

Il est clair que l'introduction d'un groupement hydrophile entraîne une solvation plus importante de la molécule. Ainsi, le 4-carboxyméthyl-KG montre une énergie de solvation 2 fois plus élevée que celles des 4-Me-KG, 4-Bn-KG et KG.

²⁶⁵ D. A. Liotard, D. G. Hawkins, G. C. Lynch, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *Journal of Computational Chemistry*, **1995**, 16, 422-440.

analogues du KG	kcat/Km	$\Delta G_{\text{solvation}}$ (kcal/mol)
KG	100	-142
4-Me-KG	26	-141
4-Bn-KG	13	-136
4-carboxyméthyl-KG	0,009	-301

Tableau 47 : Comparaison des énergies de solvation des analogues de KG.

Nous avons aussi vérifié expérimentalement que le 4-carboxyméthyl-KG **33d** n'est pas un inhibiteur de l'enzyme. En augmentant progressivement la concentration en analogue du KG **33d** (de 1 à 8 mM) en présence des substrats naturels (KG à 2mM et Asp à 40 mM), nous n'avons observé aucune diminution de l'activité de l'AspAT d'*E.coli*. Ce qui montre donc que le 4-carboxyméthyl-KG n'a pas une forte affinité pour le site actif de l'enzyme et que l'intermédiaire aldimine formé entre le PLP et ce composé se forme peut être difficilement.

1.4 Vers d'éventuels substrats immobilisés

L'analyse de la structure initiale 1ARG sur laquelle nous avons effectué un calcul de surface à l'aide du logiciel de visualisation MDL[®] CHIME, nous permet d'observer une cavité reliant le site actif à l'extérieur de l'enzyme. La figure ci-dessous permet d'observer la cavité à travers laquelle on aperçoit le complexe PLP-OA se situant à l'intérieur du site actif.

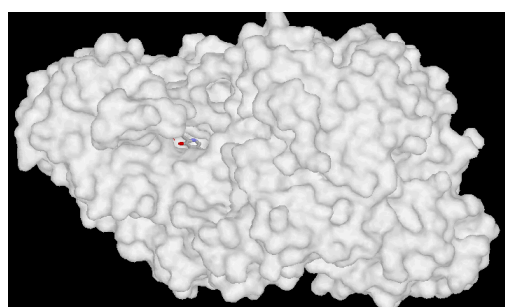


Figure 81 : Surface calculée pour le complexe Ald- OA.

Ce tunnel (ou cavité) possède un caractère hydrophobe. En effet, il est en partie constitué par les résidus Ile A37, Leu A18 et du noyau aromatique de la Tyr B70. Ce tunnel apparaît donc comme le site de fixation privilégié des substituants en position 4 de la chaîne du KG. De plus, l'observation de différentes structures de l'AspAT permet d'observer que ce

tunnel est plus ou moins ouvert suivant la nature du complexe cristallisé sous la forme ouverte ou fermée (Figure 82).

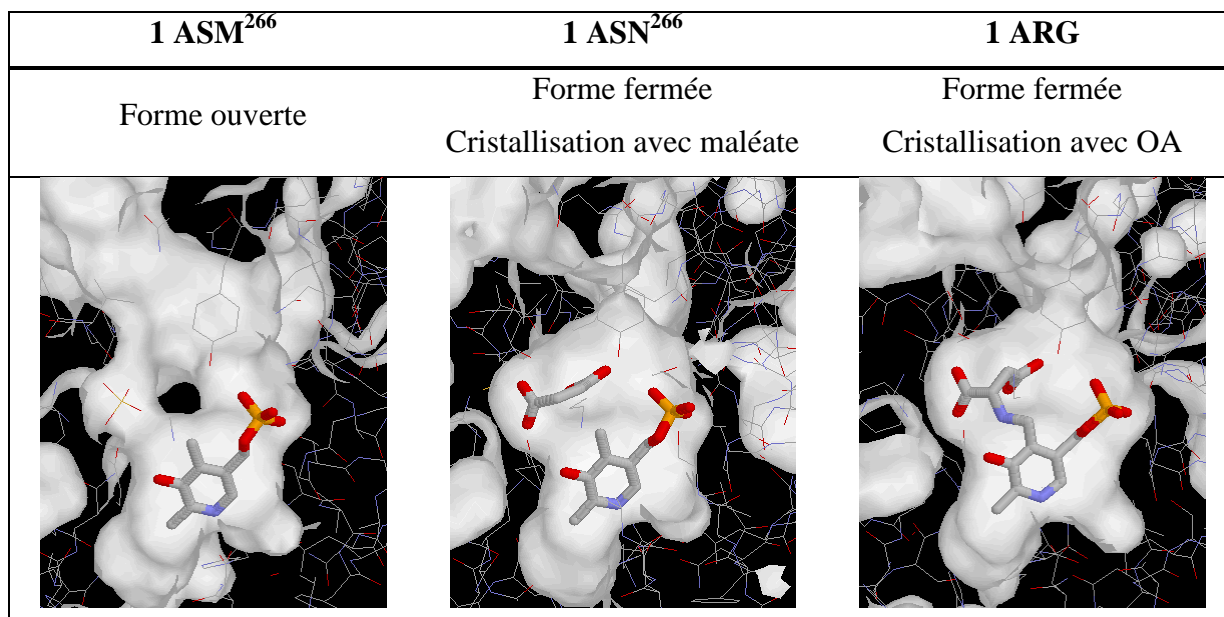


Figure 82 : différentes structures cristallines de l'AspAT de la PDB.

Nous avons donc construit un nouveau complexe Ald-(4*R*)-4-pentyl-KG à partir du (4*R*)-4-Bn-KG en orientant la chaîne pentyle dans le tunnel.

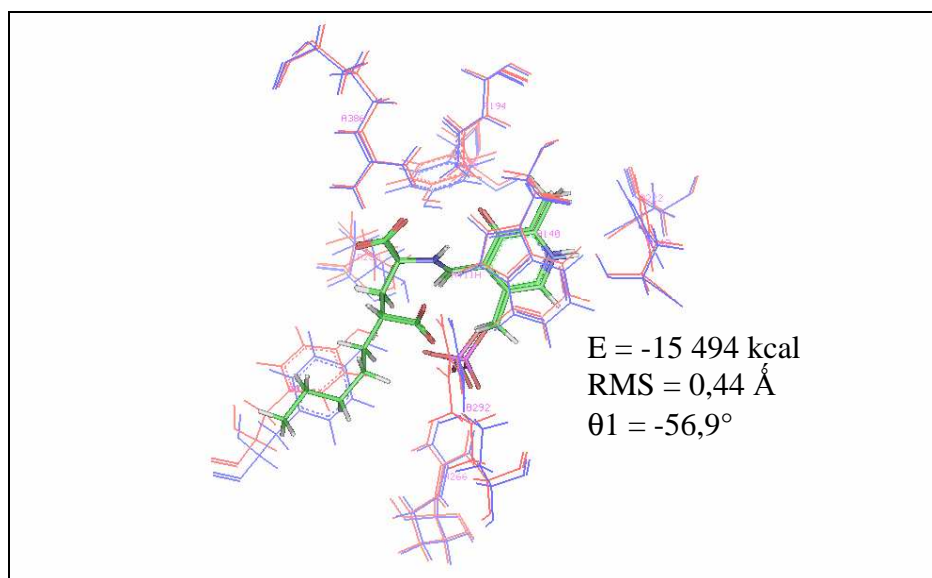


Figure 83 : Superposition des complexes respectivement Ald-KG et Ald-(4*R*)-4-pentyl-KG.

Comme nous l'avons remarqué précédemment avec les analogues 4-Me et 4-Bn, nous n'avons pas observé de modifications structurales importantes du ligand coenzyme-substrat par rapport au modèle de référence (Figure 83). La Tyr70 a légèrement pivoté tout en conservant ses interactions d'origine (représenté en bleu, Figure 84). On observe également

²⁶⁶ J. Jaeger, M. Moser, U. Sauder, J. N. Jansonius, *J. Mol. Biol.*, **1994**, 239, 285-305.

un léger décalage des résidus A37 et A18 du site actif (représentés en couleur verte, Figure 84) qui s'écartent pour accommoder la chaîne alkyle.

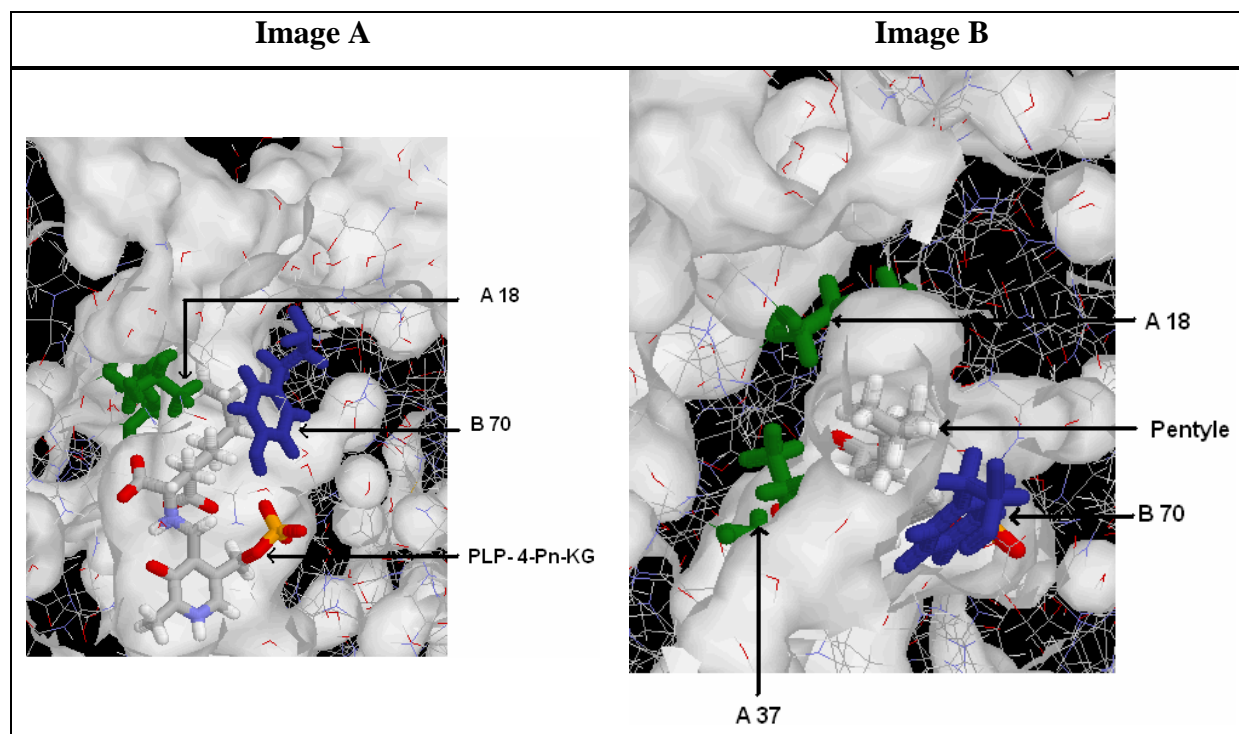


Figure 84 : image A et image B : coupe du site actif du complexe Ald-4-Pn-KG où la Tyr B70 est représentée en vert, Leu A18 et Ile A37 en bleu et le ligand en code couleur.

La figure ci-dessous montre une vue d'ensemble de l'enzyme après avoir effectué un calcul de surface à l'aide du logiciel CHIME. Nous remarquons que la chaîne pentyle (représentée en rouge) pointe vers l'extérieur de l'enzyme. Nous pouvons donc supposer que les chaînes plus longues et volumineuses se positionnent de façon semblable en « sortant » de l'enzyme à travers le tunnel.

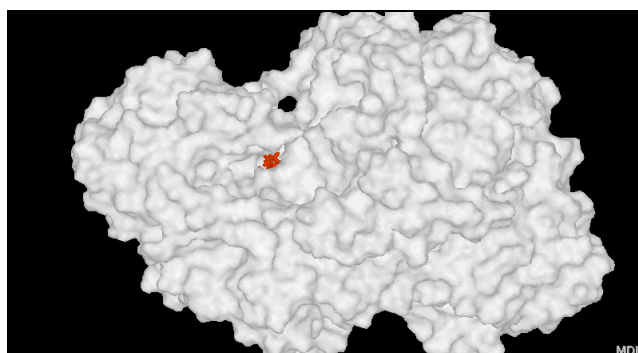


Figure 85 : vue d'ensemble de la surface du complexe Ald-(4R)-pentyl-KG.

Une autre étude a aussi concerné l'analogue **50** qui présente une longue chaîne polyéther en position 4 (Figure 86).

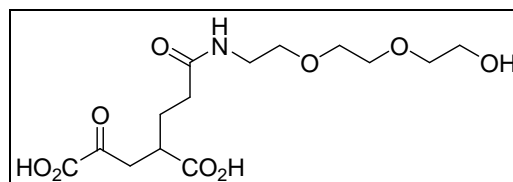


Figure 86 : analogue 50, substrat de l'AspAT d'*E.coli*

Il est vrai que l'activité de l'AspAT vis-à-vis de cet analogue est plus faible que pour les analogues 4-alkyles. Ceci pourrait être dû à l'introduction de la fonction amide et au caractère plus polaire de la chaîne triéthylèneglycol. Cependant, l'activité mesurée montre incontestablement que ce type de composé se lie efficacement au site actif de l'enzyme. Nous avons construit le complexe Ald-50 à partir du modèle obtenu avec le (4*R*)-4-Pentyl-KG. La superposition avec le modèle de référence montre une fois encore, que la structure du complexe PLP-substrat est inchangée (Figure 87). Par contre, la Tyr70, la Lys258 et d'autres acides aminés tels que la Leu 18, l'Ile 17, l'Ala 21 et l'Ile 37 se sont décalés pour accommoder la chaîne en position 4 du substrat. Ceci n'est pas surprenant puisque ces résidus sont assez « mobiles » et participent, pour la plupart, à l'ouverture et à la fermeture du site actif de l'AspAT, comme nous l'avons évoqué précédemment.

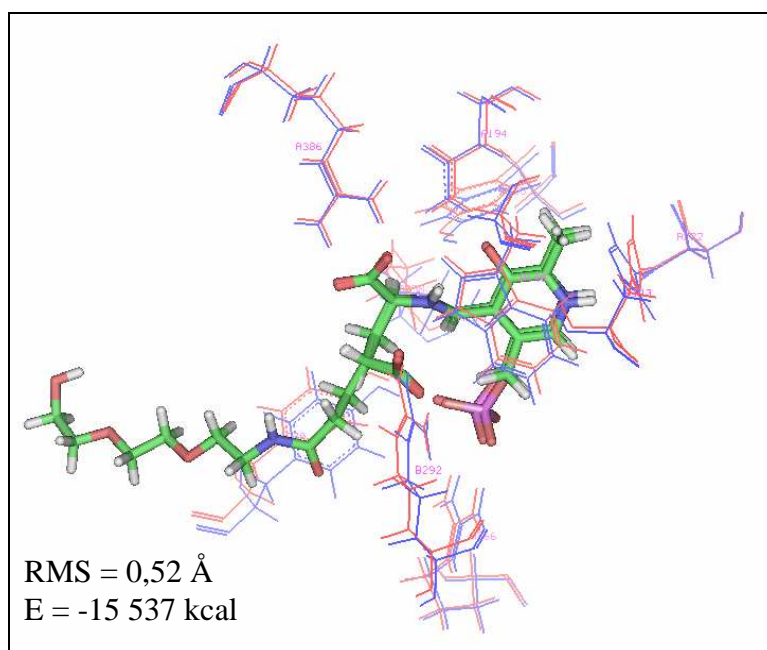


Figure 87 : Superposition des complexes respectivement Ald-KG et Ald- 50.

La figure suivante présente deux coupes du site actif et une vue d'ensemble de l'enzyme montrant la surface du complexe Ald-50. Les images A et B permettent d'observer l'accommodation de la chaîne PEG à l'intérieur du tunnel du site actif et la sortie du

groupement hydroxyle terminal à l'extérieur de l'enzyme. De même, l'image C représente une vue de l'extérieur de l'enzyme où le groupement OH est clairement visible.

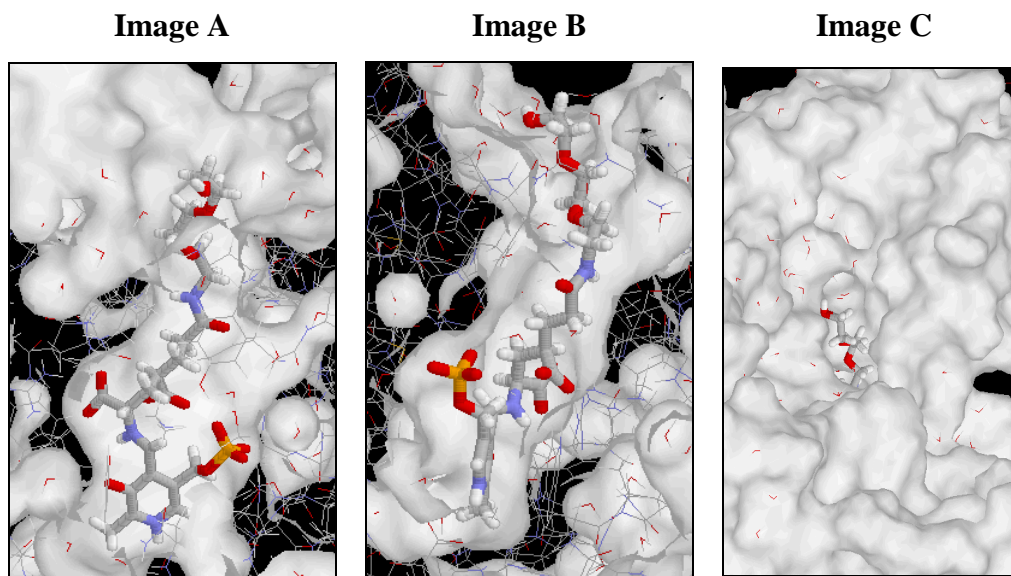


Figure 88 : Image A et B : coupes du site actif du complexe Ald-**50**, visualisation de la cavité ; Image C : surface du complexe Ald-**50**, vu de l'extérieur de l'enzyme.

Après la construction progressive de modèles dans lequel l'analogue du KG exhibe des chaînes de plus en plus longues, il paraît désormais très probable que des analogues immobilisés soient substrats de l'AspAT d'*E.coli*.

1.5 Etude des dérivés comprenant les fonctions ester et amide

Une dernière étude a également été réalisée dans le but de déterminer la raison pour laquelle l'introduction d'une fonction amide en position 4 entraîne une faible activité de l'AspAT. En effet, nous avons vu que la présence d'un ester méthylique sur le KG ne pose pas de problème à l'enzyme, alors que l'introduction d'une fonction amide diminue sévèrement l'affinité du substrat (Tableau 48).

Analogues du KG étudiés	AspAT d' <i>E. coli</i>		
	K_m (mM)	k_{cat} rel.(%)	k_{cat}/K_m rel.(%)
5f 	0,61	33	13
5k 	4,6	10	0,5

Tableau 48 : étude de spécificité des substrats **5f** et **5k** avec l'AspAT d'*E.coli*.

Nous avons donc construit deux modèles avec les substrats **5f** et **5k** à partir de la structure minimisée du complexe Ald-(4R)-4-Bn-KG (Figure 89). En effet, le positionnement de la chaîne carbonée en position 4 du KG a été orientée dans la même direction que le benzyle (et le pentyle) pour un positionnement favorable du substrat dans le site actif.

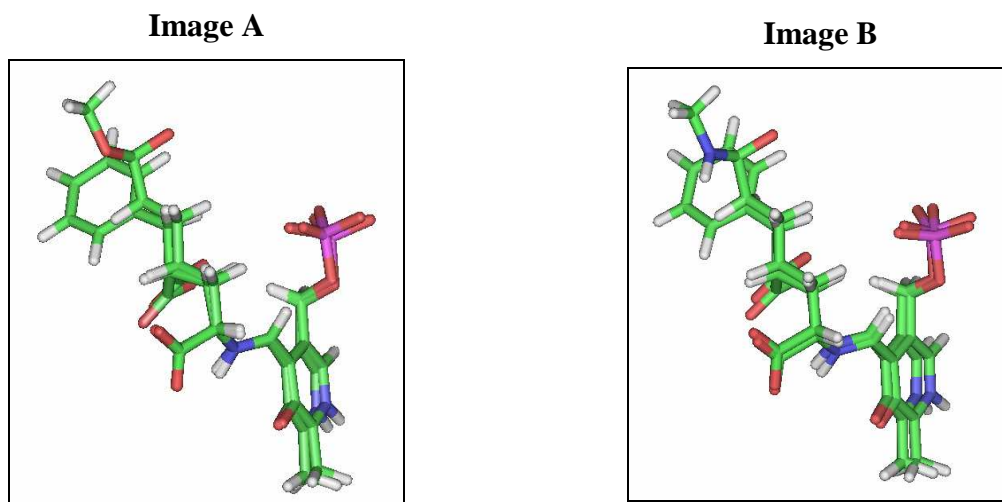


Figure 89 : construction des ligands PMP-analogues **5f** (image A) et **5k** (image B) à partir du ligand PMP-(4R)-4-Bn-KG.

Après DM et minimisation d'énergie, la superposition des structures avec le modèle de référence, montre aucune différence entre les deux structures qui sont quasi-superposables (figure, images A et B). Dans les deux cas, nous n'observons pas de modifications structurales importantes du complexe coenzyme-substrat par rapport au modèle de référence. Cependant, comme pour le dérivé pentyle, la Tyr B70 gênée stériquement par le groupement en position 4, a pivoté et d'autres acides aminés du site se sont légèrement décalés de leurs positions initiales tout en conservant leurs interactions d'origine (Figure 90).

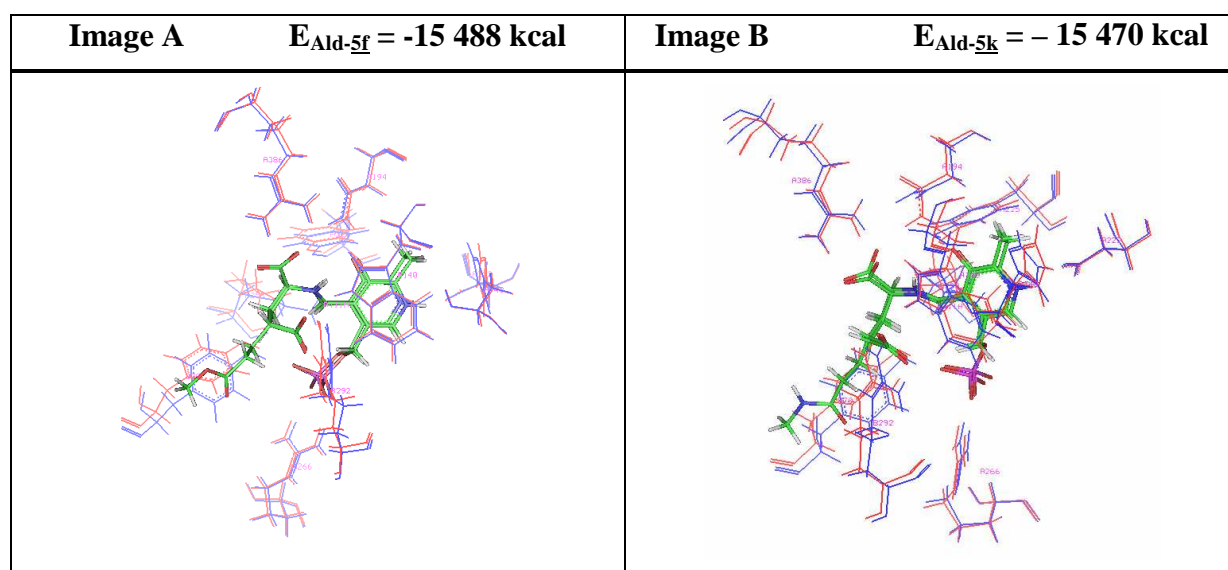


Figure 90 : image A : Superposition des complexes Ald-KG et Ald-analogue **5f**, image B : Superposition des complexes Ald-KG et Ald-analogue **5k**.

Les valeurs de RMS et des dièdres montrent quelques différences avec les valeurs de références mais les écarts sont du même ordre, même si on observe une différence plus importante pour les θ_1 et θ_2 dans le cas du composé **5k** qui, rappelons-le, est le moins bon substrat des deux (Tableau 49).

Substrats étudiés	kcat/Km (%)	θ_1 (°)	θ_2 (°)	RMS (Å)	RMS (Å)
				Atomes lourds	Backbone
KG	100	52,6	57,2	0	0
5f	13	54,2	52,9	0,45	0,36
5k	0,5	56,8	43,6	0,43	0.25

Tableau 49 : comparaison des RMS et des dièdres θ_1 et θ_2 avec l'activité mesurée.

Cette étude révèle encore les limites de notre modèle de prédiction d'activité. En effet, en modélisant l'intermédiaire aldimine externe du ligand coenzyme-substrat, nous ne pouvons rendre compte clairement de la différence d'activité vis-à-vis des analogues **5f** et **5k**. Il reste cependant vraisemblable que la différence de polarité entre les fonctions ester et amide soit à l'origine d'une baisse d'activité de l'enzyme pour les dérivés amidiques qui seraient moins bien accommodés dans le tunnel hydrophobe et présenteraient une solvation plus importante rendant difficile leur entrée dans le site actif.

Comme nous l'avons vu, les études de Docking portant sur l'intermédiaire aldimine externe nous ont permis d'expliquer l'énantiosélectivité de l'AspAT. De plus, la construction des complexes Ald-analogues du KG comportant des chaînes très longues en position 4 nous permet de penser que des analogues immobilisés sont vraisemblablement des substrats de l'enzyme. Cependant, notre modèle de prédiction d'affinité présente des limites. En effet, les analogues du KG **5k** et surtout **5d** satisfont aux critères du modèle alors qu'ils constituent de mauvais substrats de l'enzyme. Les raisons peuvent être les suivantes : soit les complexes enzyme-PLP-substrat ne se forment pas, soit la non réactivité est liée à une autre étape de la transamination. Nous avons donc envisagé d'étendre cette étude de Docking à l'intermédiaire cétime de la réaction de transamination afin de différencier l'impact du choix de l'intermédiaire réactionnel modélisé sur la validité des prédictions d'activité.

Chapitre II Etude de l'intermédiaire cétimine

II.1 Construction du modèle de référence pour l'intermédiaire cétimine : complexe

AspAT-KG

Aucune structure de l'AspAT d'*E.coli* sous forme fermée et correspondant au complexe AspAT-PLP-substrat naturel sous la forme cétimine (Cet-KG) n'est répertoriée. La structure 1MAQ correspond au complexe Cet-KG mais l'enzyme est d'origine animale (mAspAT de cœur de poulet)²²⁸. Il n'existe qu'environ 40% d'homologie de séquence entre l'AspAT d'*E.coli* et la mAspAT de poulet mais les résidus du site actif, essentiels à la catalyse, restent invariants. Pour l'élaboration de nouveaux modèles Cet-analogues du KG, nous sommes partis de la structure 1ARG. Afin de vérifier notre modèle de référence Cet-KG construit à partir de 1ARG, nous avons également complété la structure 1MAQ et minimisé son énergie après DM.

II.1.1 A partir de 1ARG

Dans un premier temps, nous avons modifié le ligand PLP-OA, initialement sous la forme aldimine externe dans 1ARG, pour obtenir la forme cétimine. Le nouveau complexe Cet-OA a ensuite subi une minimisation d'énergie suivie d'un recuit simulé en DM afin d'obtenir la structure la plus stable. Après cette étape, nous avons construit le complexe Cet-KG en rajoutant un groupement méthylène à la chaîne du substrat. Après minimisation et recuit simulé en DM, nous avons obtenu la structure présentée en rouge dans la figure ci-dessous où seul le site actif est décrit. Cette structure a constitué le modèle de référence pour cette nouvelle étude.

Les interactions essentielles à la catalyse sont conservées. Nous observons, comme avec le complexe Ald-KG, que le carboxylate γ et l'Arg292 ne sont plus coplanaires mais sont décalés d'un angle de 45-50° par rapport au complexe Cet-OA. Ceci est en accord avec les données de la littérature lors de l'étude des structures RX des complexes Cet-OA et Cet-KG (1MAQ) d'origine animale²²⁸.

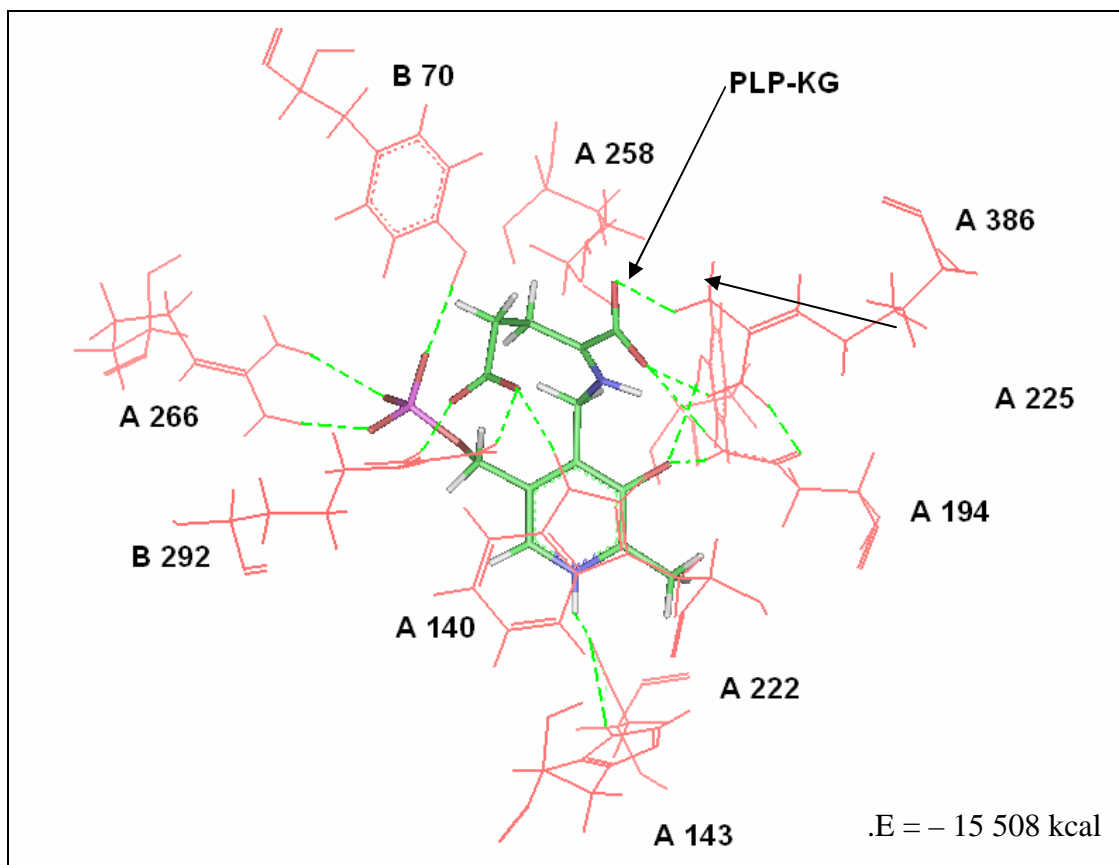


Figure 91 : structure du site actif du complexe Cet-KG construit à partir de 1ARG.

II.1.2 A partir de 1 MAQ

La structure RX 1MAQ de la mAspAT de poulet répertoriée dans la PDB ne comporte qu'une seule sous-unité sur les deux qui constituent le dimère. La génération de la seconde sous-unité de l'enzyme a été réalisée avec le logiciel Material-studio²⁶⁷ en appliquant une symétrie par rapport à un axe de type C2. Après minimisation d'énergie, nous avons obtenu une structure de l'enzyme dans laquelle l'imine et le cycle pyridinium du coenzyme sont coplanaires, bien qu'ils soient maintenant séparés par un groupement méthylène (sp3) et donc non conjugué (Figure 92).

La plupart des interactions essentielles à la catalyse semblent conservées. Mais nous avons perdu les 2 liaisons hydrogènes entre l'Arg 386 et le groupement carboxylate α ($d = 3,5$ Å), celles entre l'Asn 194 et le Trp 140 ($d = 2,8$ Å), ainsi que la liaison hydrogène entre l'His 143 et l'Asp 222 ($d = 2,8$ Å). Cependant, il se peut que la génération de la seconde sous-unité de la structure 1MAQ ait entraîné des erreurs dans la structure de départ.

²⁶⁷ MS Modeling v 4.0.0.0, © 2005 Accelrys Software Inc., USA.

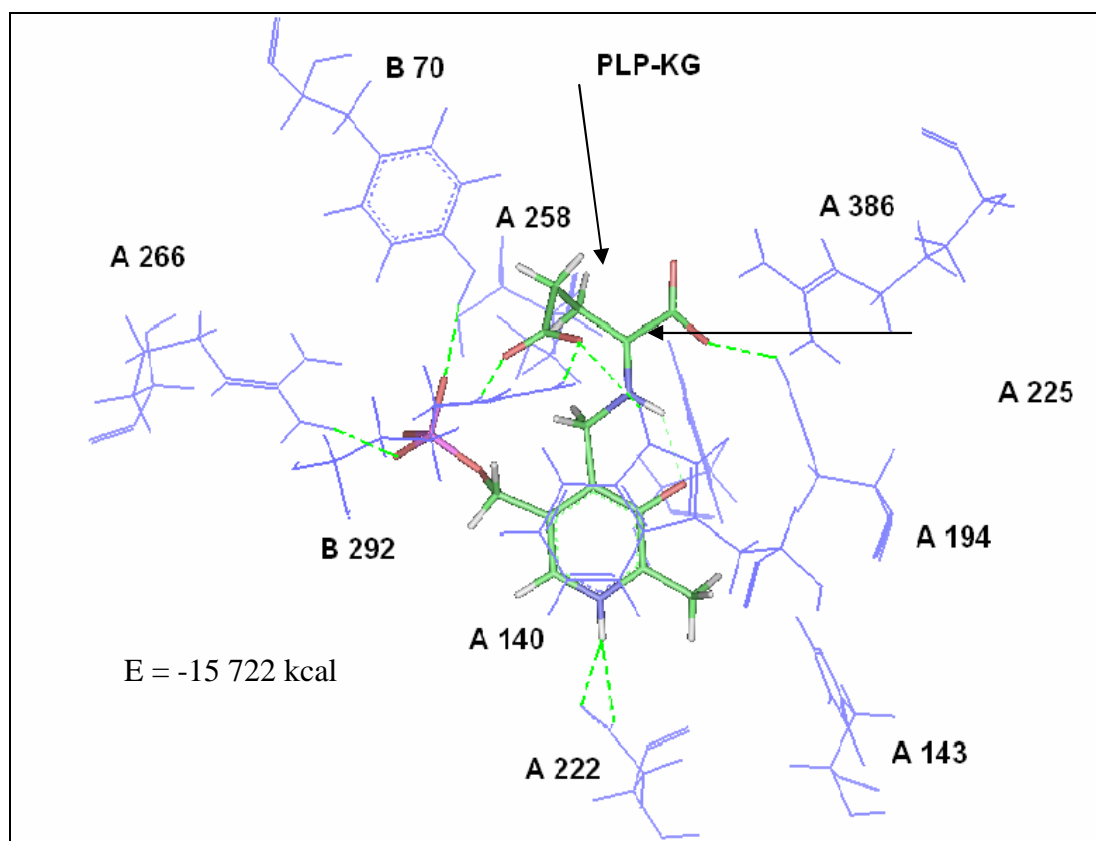


Figure 92 : structure du site actif du complexe Cet-KG.

La figure suivante montre la superposition des ligands PMP-KG des modèles construits à partir de 1ARG (en bleu) et de 1MAQ (en rouge).

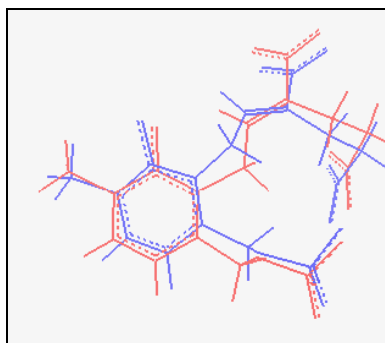


Figure 93 : superposition des ligands PLP-KG dans les modèles Cet-KG construits à partir des structures 1ARG (en rouge) et 1MAQ (en bleu).

Il est clair que la structure du ligand PMP-KG du modèle obtenu à partir de 1ARG n'est pas identique à celle obtenue à partir de 1MAQ : en particulier, dans le cas du modèle Cet-KG construit à partir de 1ARG, on observe que l'imine et le cycle pyridinium ne sont pas coplanaires. Le fait d'être passé de l'intermédiaire aldimine à l'intermédiaire cétime a supprimé la conjugaison qui existait entre l'imine et le cycle pyridinique du coenzyme. Dans ce cas, il n'est pas improbable que le ligand PMP-substrat adopte une conformation moins

plane que celle de l'intermédiaire aldimine. Nous avons donc poursuivi notre étude en construisant les complexes Cet-4-Me-KG à partir du modèle de référence initialement obtenu à partir de 1ARG.

II.2 Analyse de l'énantiosélectivité de l'AspAT sur la base des complexes cétimines

La démarche suivie pour la construction et les calculs pour les complexes Cet-(4*R*)-4-Me-KG et Cet-(4*S*)-4-Me-KG a été similaire à celle effectuée pour l'étude de l'intermédiaire aldimine. La figure suivante présente la superposition des complexes Cet-4-Me-KG avec la structure de référence du complexe Cet-KG.

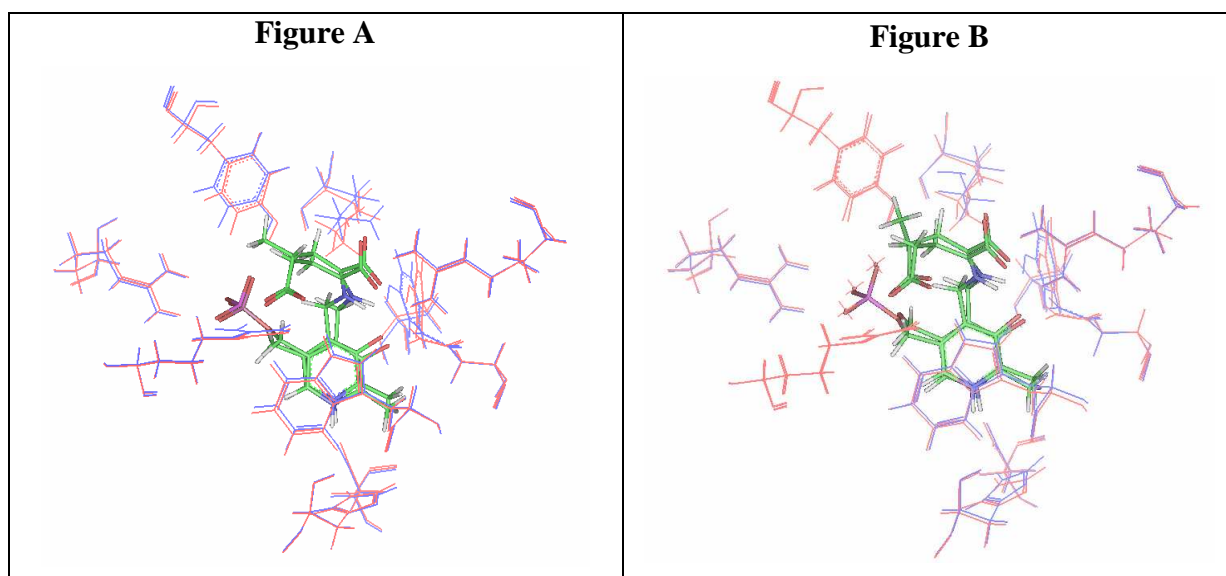


Figure 94 : **image A :** superposition de la structure du site actif du complexe Cet-(4*R*)-4-Me-KG (en bleu) avec le modèle de référence (en rouge) ; **image B :** superposition de la structure du site actif du complexe Cet-(4*S*)-4-Me-KG (en bleu) avec le modèle de référence (en rouge).

Le tableau ci-dessous permet de comparer les énergies et les valeurs des RMS mesurées lors de la superposition du backbone et des atomes lourds des complexes AspAT-4-Me-KG et du modèle de référence.

analogues de Glu étudiés	kcat/K _m (%)	RMS (Å) Atomes lourds	Energie (kcal)
KG	100	0	-15 494
(4 <i>R</i>)-4-Me-KG	26	0,15	- 15 517
(4 <i>S</i>)-4-Me-KG	0,04	0,13	- 15 518

Tableau 50 : comparaison des coefficients RMS.

Les énergies des deux complexes Cet-4-Me-KG sont très proches. Les valeurs du RMS montrent que l'introduction du groupement méthyle en position 4*R* ou 4*S* au niveau de l'intermédiaire cétimine, semble engendrer de faibles perturbations dans le site actif de l'AspAT. Contrairement aux observations faites dans le cas de l'intermédiaire aldimine, l'accommodation de l'isomère (4*S*)-4-Me-KG dans le site actif se fait donc aussi bien que celle du (4*R*)-4-Me-KG.

L'étude de l'intermédiaire cétimine pour les complexes Cet-KG et Cet-4-Me-KG, ne nous a donc pas permis d'obtenir des informations supplémentaires expliquant l'énantiosélectivité de l'AspAT en faveur de l'isomère 4*R* du 4-Me-KG. Il est possible que la différence d'activité des deux énantiomères repose essentiellement sur l'accommodation du groupement méthyle au niveau de l'intermédiaire aldimine et non cétimine, ce dernier étant moins contraints en raison de l'absence de conjugaison entre l'imine et le cycle pyridinique du PLP. Cependant, comme nous l'avons évoqué, notre modèle de référence pour l'intermédiaire cétimine diverge de la structure RX 1MAQ et des expériences de modélisation sont sans doute nécessaires pour le valider.

Chapitre III Conclusion et perspectives

L'étude du complexe PLP-substrat sous la forme de l'intermédiaire aldimine construit à partir de la structure 1ARG nous a permis d'éclairer l'énantiosélectivité de l'AspAT d'*E.coli* en faveur de l'isomère (4*R*) des analogues alkylés du KG, substrats de l'enzyme. Un modèle de prédiction d'affinité a été réalisé en prenant en compte les valeurs des coefficients RMS et de certains critères structuraux comme les valeurs de l'angle dièdre θ_1 du ligand PLP-substrat. Malgré certaines limites de ce modèle, l'étude de cet intermédiaire aldimine pour des analogues du KG présentant de longues chaînes nous a également permis de montrer qu'un substrat de l'AspAT d'*E.coli*, immobilisé sur support solide, pouvait être envisagé.

En ce qui concerne les perspectives de ce travail, il convient peut-être de remettre en cause certains choix initiaux :

Pour s'affranchir de l'existence réelle des intermédiaires covalents de la transamination, il serait alors très intéressant de modéliser l'approche du substrat dans le site actif. Dans ce cas, il faudrait partir de structures cristallines dans lesquelles le substrat n'est pas lié de façon covalente au coenzyme PLP. En effet, cette nouvelle approche permettrait probablement de déterminer si les analogues du KG substitués par des groupements polaires ont difficilement accès au site actif de l'enzyme.

Cette approche a été récemment développée au cours d'une étude décrite dans la littérature²⁶⁸ et concernant la Tyrosine-AT d'*E.coli* : la modélisation des intermédiaires non covalents de type PLP-substrat a permis notamment de corréler l'activité catalytique de l'enzyme avec la distance entre l'amine du substrat et l'imminium de l'aldimine interne.

²⁶⁸ B. G. Kim et al., *Biotechnology and Bioengineering*, **2004**, 88, 512-519.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I Synthèse des analogues du KG 5

1.1 Généralités

Les produits commerciaux sont utilisés sans purification préalable. Les solvants anhydres utilisés sont séchés et distillés selon les procédures usuelles (C_6H_6 et Et_2O sur Na, MeOH sur Mg/I_2 , CH_2Cl_2 sur $CaCl_2$, Pyridine sur KOH...)

Les chromatographies sur couches minces sont effectuées sur gel de silice (Merk, support aluminium, 60F254). Le solvant d'élution varie suivant les produits. Les plaques sont révélées par exposition sous U.V, puis trempage dans une solution éthanolique d'acide sulfurique de 10% contenant 1% de vanilline suivi d'un chauffage, ou par trempage dans une solution de $KMnO_4$ dans l'eau suivi d'un chauffage pour les composés nitrés et les composés aminés. La ninhydrine (solution à 2 % dans EtOH) est le révélateur caractéristique des acides aminés et sera utilisé pour révéler les analogues de Glu.

Les chromatographies sur colonnes sont effectuées avec de la silice MN Kieselgel 60 M (0,04-0,063 mm/ 230-400 mesh, chez Macherey-Nagel)

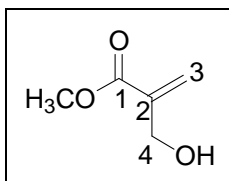
Les spectres de RMN sont enregistrés sur un appareil Bruker Avance-400 (1H : 400 MHz ; ^{13}C : 100 MHz). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par référence au tétraméthylsilane. La numérotation des molécules encadrées utilisée est celle de la nomenclature. Les abréviations utilisées sont : m multiplet ; s singulet ; d doublet ; t triplet, dd doublet dédoublé, ddd doublet dédoublé dédoublé, q quadruplet, quint. quintuplé.

Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil de type Hewlett packard MS Engine 5989B équipé de 3 modes d'ionisation (Impact électronique, Ionisation chimique, Electrospray).

Les spectres IR sont réalisés sur un appareil FT IR Paragon 880 PERKIN ELMER. Pour les produits liquides, on réalise un film entre deux pastilles de KBr. Dans le cas de produits solides, on prépare une pastille de KBr (avec 1% de produit).

Les mesures de pouvoir rotatoire sont effectuées sur le polarimètre Jasco DIP-370, à la longueur d'onde de la raie du sodium (589 nm). Les mesures se font à température constante et les concentrations sont exprimés en g/100mL.

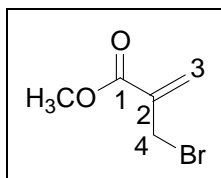
Les points de fusion sont, quant à eux, réalisés à l'aide d'un microscope REICHERT 2849223

I.2 Synthèse de l'acide 2-(benzyloxyméthyl)-4-oxoglutarate de dilithium **5a****2-(hydroxyméthyl)-prop-2-énoate de méthyle 6 (C₅H₈O₃, 116,12 g/mol)**

A un mélange de triméthylphosphonoacétate (31,7 mL, 220 mmol) et de formaldéhyde (solution aqueuse à 37 %, 60 mL, 740 mmol), sous agitation forte, une solution de K₂CO₃ (33,45 g dans 20 mL d'eau distillée, 242 mmol) est ajoutée goutte à goutte de telle sorte à ne pas dépasser 35-40 °C. Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 5 minutes à 30-35 °C puis refroidi à température ambiante. De l'Et₂O (75 mL) et une solution aqueuse saturée en NaCl (75 mL) sont alors ajoutés. La phase aqueuse est extraite avec de l'Et₂O (3 x 60 mL). Les phases organiques sont rassemblées puis lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl (100 mL), séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite après addition d'hydroquinone (2 mg). Le résidu est ensuite distillé sous pression réduite (Eb = 54 °C, 1 mmHg). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (16 g, **63 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,76 (1 H, d, *J* = 4,8 Hz, OH), 3,69 (3 H, s, OCH₃), 4,25 (2 H, d, *J* = 6,2 Hz, H⁴), 5,79 (1 H, s, H^{3a}), 6,20 (1 H, s, H^{3b}).

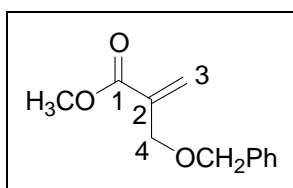
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 51,8 (OCH₃), 60,9 (C⁴), 124,8 (C³), 140,1 (C²), 166,1 (C¹).

2-(bromométhyl)prop-2-énoate de méthyle 7 (C₅H₇O₂Br, 179,01 g/mol)

Une solution de 2-(hydroxyméthyl)prop-2-énoate de méthyle **6** (16,1 g, 138,6 mmol) dans Et₂O anhydre (110 mL) est refroidie à - 10 °C (bain de glace salé). PBr₃ (6,05 mL, 63,7 mmol) est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante pendant 4 h. Après refroidissement à - 10 °C, on additionne H₂O (80 mL) au milieu réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec de l'hexane (3 x 60 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (21,1 g, **85 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,80 (3 H, s, OCH₃), 4,19 (2 H, s, H⁴), 5,97 (1 H, s, H^{3a}), 6,34 (1 H, s, H^{3b}).

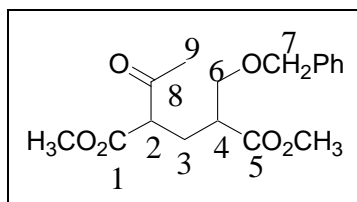
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 29,3 (C⁴), 52,3 (OCH₃), 129,2 (C³), 137,3 (C²), 165,3 (C¹).

2-(benzyloxyméthyl)prop-2-énoate de méthyle 1a (C₁₂H₁₄O₃, 206,24 g/mol)

L'alcool benzylique (5,4 mL, 51,8 mmol) est ajouté à une solution de 2-(bromométhyl)prop-2-énoate de méthyle 7 (5 g, 27,9 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). Après refroidissement à 0 °C, une solution de DABCO (4,37 g, 39 mmol) dans le THF anhydre (20 mL) est ajoutée goutte à goutte. Un précipité blanc se forme instantanément. Le milieu réactionnel est chauffé à 70 °C pendant 26 h. Après filtration du milieu réactionnel, le filtrat est lavé avec une solution aqueuse d'HCl à 1 % (2 x 20 mL), une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (20 mL) et une solution aqueuse saturée en NaCl (20 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : CH₂Cl₂). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (4,6 g, **80 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,69 (3 H, s, OCH₃), 4,17 (2 H, s, H⁴), 4,52 (2 H, s, OCH₂Ph), 5,87 (1 H, s, H^{3a}), 6,26 (1 H, s, H^{3b}), 7,24 (5 H, m, Har).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 51,5 (OCH₃), 68,5 (C⁴), 72,8 (OCH₂Ph), 125,6 (C³), 127,5, 127,9 et 128,3 (CHar), 137,6 et 138,2 (Car et C²), 166,2 (C¹).

2-acétyl-4-(benzyloxyméthyl)glutarate de diméthyle 2a (C₁₇H₂₂O₆, 322,36 g/mol)

A une solution de 2-(benzyloxy)prop-2-énoate de méthyle 7 (2,15 g, 10,42 mmol) dans MeOH (40 mL), on additionne le fluorure de potassium (1,81 g, 31,25 mmol) puis l'acétoacétate de méthyle (1,9 mL, 17,71 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 68 °C pendant 16 h. Après refroidissement à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec de AcOEt (4 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; CH₂Cl₂/CH₃OH : 99/01). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (3,2 g, **95 %**).

On observe la présence des diastéréoisomères dans un rapport 1/1.

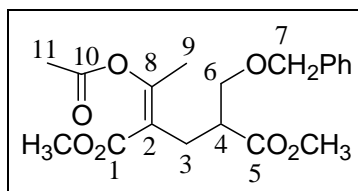
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,10-2,27 (2 x 2H, m, H³), 2,22-2,24 (2 x 3H, 2 x s, H⁹), 2,69 (2 x 1H, m, H⁴), 3, 57-3,76 (2 x 3H, m, H⁶ et H²), 3,69 (2 x 3H, s, 2 x OCH₃), 3,70 (3H, s, OCH₃), 3,73 (3H, s, OCH₃), 4,49 (2 x 2H, m, H⁷), 7,33 (2 x 5H, m, Har).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 26,8 et 26,9 (C³), 29,0 et 29,5 (C⁹), 43,5 et 43,6 (C⁴), 51,9 et 52,5 (OCH₃), 56,8 et 57,2 (C²), 70,3 et 70,7 (C⁶), 73,1 (C⁷), 127,6, 127,7 et 128,4 (CHar), 137,8 (Car), 169,6 (C¹), 173,7 (C⁵), 202,5 (C⁸).

IR (film, cm^{-1}) : 3009 (C-Har v), 2954, 2864 (C-Halk v), 1738, 1721 (C=O v), 1439 et 1361 (C-H δ), 1246, 1204, 1167 (C-O v), 745 et 701 (C-Har δ).

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$: 345,1314, exp : 345,1306.

2-(1-acétoxyéthylidène)-4-(benzyloxyméthyl)glutarate de diméthyle 3a ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7$, 364,39 g/mol)



Une solution de produit de Michael 2a (2,6 g, 8,1 mmol) dans la pyridine distillée (15 mL) est refroidie à 0 °C. On ajoute le chlorure d'acétyle (0,86 mL, 12,1 mmol). Un précipité blanc se forme. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 48 h. L' Et_2O (50 mL) est ajouté puis la phase organique est lavée avec de l'eau (50 mL) et une solution aqueuse saturée en CuSO_4 (2 x 50 mL). La phase organique est alors séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/ AcOEt : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (1,9 g, **64** %). On n'observe qu'un seul stéréoisomère.

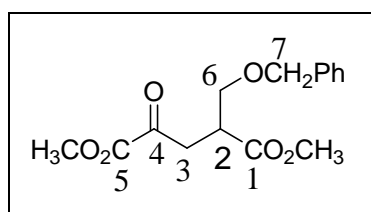
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,13 (3 H, s, H^{11}), 2,31 (3 H, s, H^9), 2,60 (2 H, m, H^3), 2,84 (1 H, m, H^4), 3,56 (1 H, dd, $J = 5,5$ et $9,0$ Hz, H^{6a}), 3,64 (1 H, dd, $J = 7,2$ et $9,0$ Hz, H^{6b}), 3,69 (3 H, s, OCH_3), 3,79 (3 H, s, OCH_3), 4,51 (2 H, m, AB, H^7), 7,31 (5H, m, Har).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 19,6 (C^9), 20,8 (C^{11}), 26,4 (C^3), 45,0 (C^4), 51,8 (2 x OCH_3), 70,1 (C^6), 73,0 (C^7), 119,2 (C^2), 128,3 et 127,5 (CHar), 138,1 (Car), 158,7 (C^8), 167,4 (C^1), 168,1 (C^{10}), 174,1 (C^5).

IR(film, cm^{-1}) : 3030, 2953, 2868 (C-H v), 1762, 1723 (C=O v), 1438 et 1372 (C-H δ), 1213, 1174 (C-O v), 745 et 701 (C-Har δ).

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{Na}$ 387,1420, exp : 387,1427.

2-(benzyloxyméthyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 4a ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_6$, 294,30 g/mol)



Méthode par ozonolyse :

Une solution d'acétate d'énol 3a (0,42 g 1,15 mmol) dans CH_2Cl_2 anhydre (8 mL) est refroidie à - 70 °C. On fait buller un mélange d' O_3/O_2 généré par un ozoneur pendant 45 minutes jusqu'à ce qu'une légère coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par un flux d' O_2 pur (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (0,15 mL, 1,65 mmol) est ensuite ajouté puis le milieu est agité pendant 4 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé avec H_2O (10 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous

pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/acétate d'éthyle : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (58 mg, **17 %**).

Méthode par oxydation avec RuO₂ :

L'acétate d'énol **3a** (0,833 g, 2,28 mmol) est dissous dans un mélange de CH₃CN (8 mL) et de CHCl₃ (8 mL). On ajoute successivement le périodate de sodium (1,95 g, 9,12 mmol), l'oxyde de ruthénium (0,06g, 0,456 mmol) et H₂O (15 mL). Le milieu est ensuite fortement agité à température ambiante pendant 4 h. Le mélange est filtré sur célite. La phase aqueuse est extraite avec du CHCl₃ (10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant; cyclohexane/acétate d'éthyle : 7/3). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (290 mg, **43 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,07 (1H, dd, *J* = 5,3 et 18,1 Hz, H^{3a}), 3,28 (1H, m, H²), 3,42 (1H, dd, *J* = 8,0 et 18,1 Hz, H^{3b}), 3,60-3,75 (2H, m, H⁶), 3,69 (3H, s, OCH₃), 3,83 (3H, s, OCH₃), 4,48 (2H, s, H⁷), 7,32 (5H, m, Har).

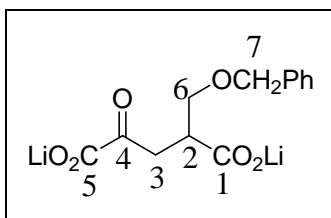
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 38,1 (C³), 41,2 (C²), 52,2 et 53,0 (OCH₃), 69,4 (C⁶), 73,1 (C⁷), 127,8 et 128,4 (CHar), 137,6 (Car), 160,9 (C⁵), 172,5 (C¹), 191,9 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 3030, 2954, 2866 (C-H v), 1736 (C=O v), 1440 et 1366 (C-H δ), 1259 (C-O v), 743 et 701 (C-Har δ).

SM (ES+) *m/z* calc pour C₁₅H₁₈O₆Na : 317,1001, exp : 317,1008.

Analyse élémentaire : calculé pour C₁₅H₁₈O₆ (%) : C : 61,22, H : 6,16
trouvé (%) C : 60,92, H : 6,32.

2-(benzyloxymethyl)-4-oxoglutarate de dilithium **5a** (C₁₃H₁₂O₆Li₂, 278,11 g/mol)



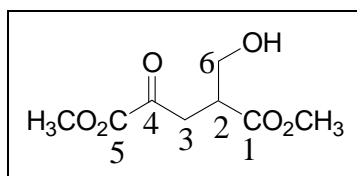
Le diester **4a** (0,236 g, 0,8 mmol) est dissous dans le MeOH (4,2 mL). Une solution aqueuse de LiOH 0,4M (4,2 mL, 1,7 mmol) fraîchement préparée est ajoutée goutte à goutte pendant 15 minutes. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Le pH du milieu est ajusté à 7,6 par ajout de résine acide (DOWEX 50WX8 H⁺). Après filtration et évaporation des solvants, le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (220 mg, **quantitatif**).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 2,90 (1H, dd, *J* = 4,8 et 17,2 Hz, H^{3a}), 2,96 (1H, m, H²), 3,05 (1H, dd, *J* = 7,3 et 17,1 Hz, H^{3b}), 3,58 (1H, dd, *J* = 6,7 et 9,8 Hz, H^{6a}), 3,69 (1H, dd, *J* = 6,0 et 9,7 Hz, H^{6b}), 4,52 (2H, s, H⁷), 7,38 (5H, m, Har).

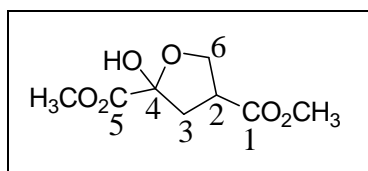
RMN ¹³C (100 MHz, D₂O, pH 7,4) δ 39,3 (C³), 43,6 (C²), 71,1 (C⁶), 72,6 (C⁷), 128,1, 128,3 et 128,7 (CHar), 137,4 (Car), 169,4 (C⁵), 180,6 (C¹), 204,1 (C⁴).

IR (KBr, cm⁻¹) : 2930 (C-H v), 1718 (C=O v), 1648 et 1590 (C=C v), 1423 et 1362 (C-H δ), 1096 (C-O v), 739 et 703 (C-Har δ).

SM (ES-) *m/z* calculée pour C₁₃H₁₂O₆Li : 271,0794, exp : 271,0795.

I.3 Synthèse de l'acide 2-(hydroxyméthyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5i**2-(hydroxyméthyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 4i** (C₈H₁₂O₆, 204,18 g/mol)

A une solution de produit benzylé 4a (139 mg, 0,47 mmol) dissous dans le MeOH (8 mL), est additionné du Pd/C à 10 % (20 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h à température ambiante sous une atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur membrane millipore et évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 5/5). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (93 mg, **97 %**) et correspond à un mélange de 2 formes cycliques diastéréoisomères dans un rapport 1/1.



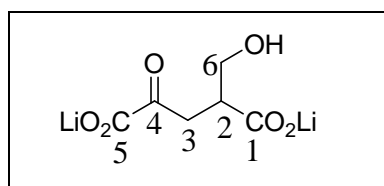
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,31 (1H, dd, *J* = 8,0 et 13,1 Hz, H^{3a}), 2,42 (1H, dd, *J* = 5,7 et 13,7 Hz, H^{3a}), 2,68 (1H, dd, *J* = 9,2 et 13,9 Hz, H^{3b}), 2,71 (1H, dd, *J* = 9,4 et 13,8 Hz, H^{3b}), 3,29 (1H, m, H⁴), 3,43 (1H, m, H⁴), 3,71 et 3,73 (2 x 3H, s, OCH₃), 3,808 et 3,873 (2 x 3H, s, OCH₃), 4,12 (1H, s, OH), 4,13–4,32 (2 x 2H, m, H⁶), 4,44 (1H, s, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 38,3 (2 x C³), 42,7 et 43,6 (C⁴), 52,3 et 52,4 (OCH₃), 53,2 et 53,3 (OCH₃), 70,4 (2 x C⁶), 102,2 et 102,6 (C¹), 170,2, 170,5, 172,3 et 173,4 (2 x C¹ et 2 x C⁵).

IR (film, cm⁻¹) : 3458 (O-H v), 2959, 2901 (C-H v), 1737 (C=O v), 1441 (C-H δ), 1274 et 1119 (C-O v).

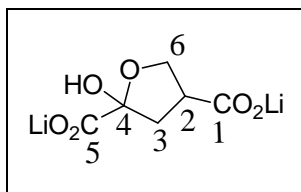
SM (ES⁺) *m/z* calculée pour C₈H₁₂O₆Na 227,0532, exp : 227,0536

Analyse élémentaire : calculé pour C₈H₁₂O₆ (%) C : 47,06, H : 5,92
trouvé (%) C : 46,95, H : 5,96.

2-(hydroxyméthyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5i (C₆H₆O₆Li₂, 187,99 g/mol)

Le diester 4i (0,093 g, 0,456 mmol) est dissous dans le MeOH (2,4 mL). Une solution aqueuse de LiOH 0,4 M (2,4 mL, 0,96 mmol) fraîchement préparée est ajoutée goutte à goutte pendant 5 minutes. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Le

pH du milieu est ajusté à 7,6 par ajout de résine acide (DOWEX 50WX8 H⁺). Après filtration et évaporation des solvants, le produit obtenu est isolé sous la forme d'un solide blanc (83 mg, **quantitatif**) et correspond à un mélange de 2 formes cycliques diastéréoisomères dans un rapport 1/1.



RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 2,34 et 2,58 (2 x 2H, m, H³), 3,28 (1H, m, H²), 3,34 (1H, m, H²), 4,11-4,42 (2 x 2H, m, H⁶).

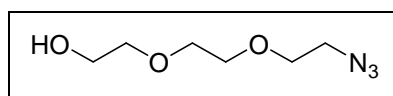
RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 40,1 et 40,5 (C³), 45,3 et 46,3 (C²), 71,2 et 71,3 (C⁶), 104,1 et 104,5 (C⁴), 176,7, 176,9, 180,8 et 182,1 (2 x C¹ et 2 x C⁵).

IR (KBr, cm⁻¹) : 3426 (O-H v), 1620 (large, C=O v), 1413 et 1309 (C-H δ), 1110 (C-O v).

SM (ES⁺) : m/z calculée pour C₆H₇O₆ : 175,0243, exp : 175,0236.

*I.4 Synthèse de l'acide 2-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-4-oxopentanedioate de dilutium **5b***

2-[2-(azidoéthoxy)-2-éthoxy]éthanol 8 (C₆H₁₃N₃O₃, 175,19 g/mol)



Méthode A

Le 2-(2-chloroéthoxy)éthoxyéthanol (5 g, 0,03 mol) est dissous dans EtOH (10 mL). On ajoute le NaI (443 mg, 0,003 mol) puis le NaN₃ (1,92g, 0,03 mol). Le milieu réactionnel est porté au reflux de EtOH pendant 48 heures. Le milieu est concentré sous pression réduite et repris dans CH₂Cl₂ (25 mL). Après une nuit à 5 °C, le milieu est filtré. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie éclair (élution ; 95/5 : CH₂Cl₂/acétone). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (4,2 g, **80 %**)

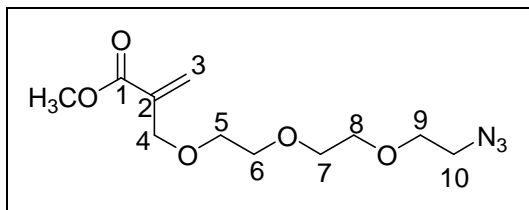
Méthode B

2-(2-chloroéthoxy)éthoxyéthanol (5 g, 0,03 mmol) est dissous dans H₂O (5 mL). Le NaN₃ (2,3 g, 0,035 mmol) et le NH₄Cl (2,3 g) sont ajoutés. Le milieu est chauffé à 70 °C pendant 4 jours. Un minimum d'eau ajouté est additionné au milieu pour dissoudre le NH₄Cl en suspension. La phase aqueuse est ensuite extraite à l'éther (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (4,9 g, **93 %**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,48 (1H, s élargi, OH), 3,33 (2H, m, CH₂N₃), 3,55 (2H, m, OCH₂), 3,61 (6H, m, OCH₂), 3,67 (2H, m, OCH₂)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 50,7 (CH₂N₃), 61,0 (CH₂OH), 69,6, 69,7, 70,3, 72,1 (OCH₂)

2-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)acrylate de méthyle 1b (C₁₁H₁₉N₃O₅, 273,29 g/mol)



Après refroidissement à 0 °C d'une suspension de NaH (0,444 g, 11,1 mmol) dans le THF anhydre (8 mL), on ajoute goutte à goutte une solution du composé **8** (1,95 g, 11,1 mmol) dans le THF anhydre. Le milieu est agité 30 min à température ambiante. Cette solution est ensuite additionnée lentement à une solution d'acrylate n° dans le THF (8 mL) préalablement refroidi à 0 °C. Un précipité blanc apparaît et jaunit au cours de la réaction. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 8 h. Après neutralisation du milieu par ajout d'acide acétique concentré, on ajoute H₂O (15 mL). La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 7/3 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (2,2 g, **73 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,37 (2H, t, *J* = 5 Hz, H¹⁰), 3,65 (10H, m, 5 x OCH₂), 3,75 (3 H, s, OCH₃), 4,23 (2 H, s, H⁴), 5,89 (1 H, s, H^{3a}), 6,29 (1 H, s, H^{3b})

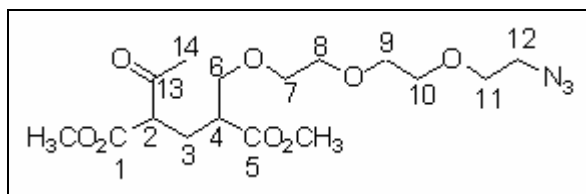
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 50,7 (C⁹), 51,8 (OCH₃), 69,3 (C⁴), 70,1, 70,2 et 70,6 (OCH₂), 70,7 (2 x OCH₂), 125,9 (C³), 137,0 (C²), 166,3 (C¹)

IR (film, cm⁻¹) : 2949 et 2870 (C-H alkyles v), 2111 (N₃ v), 1725 (C=O ester v), 1636 (C=C v), 1442 (C-H δ), 1306, 1285, 1112 (C-O v)

SM (ES⁺) *m/z* calc pour C₁₁H₁₉N₃O₅Na : 296,1222, exp : 296,1230

Analyses élémentaires : calculées pour C₁₁H₁₉N₃O₅ (%) C : 48,34, H : 7,01, N : 15,38
trouvées (%) C : 47,95, H : 6,99, N : 15,46

2-acetyl-4-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutarate de diméthyle 2b (C₁₆H₂₇N₃O₈, 389,40 g/mol)



A une solution d'acrylate **1b** (1,8 g, 6,6 mmol) dans MeOH (35 mL), on additionne le fluorure de potassium (0,928 g, 19,8 mmol) puis l'acétoacétate de méthyle (1,07 mL, 9,9 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 68 °C pendant 6 h. Après refroidissement à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (4 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 5/5 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (1,62 g, **63 %**).

On observe la présence des diastéréoisomères dans un rapport 1/1.

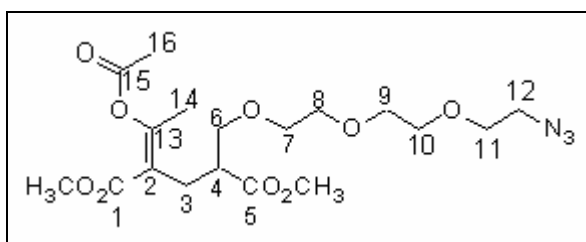
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,13 (2 x 2H, m, H^3), 2,24 (3H, s, H^{14}), 2,26 (3H, s, H^{14}), 2,66 (2 x 1H, m, H^4), 3,38 (2 x 3H, t, $J = 5,0 \text{ Hz}$, H^{12}), 3,55 à 3,66 (13 H, m, H^2 et 6 x OCH_2), 3,67 (2 x 3H, s, 2 x OCH_3), 3,72 (3H, s, OCH_3), 3,73 (3H, s, OCH_3)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 25,5 et 25,7 (C^3), 27,8 et 28,2 (C^{14}), 42,2 et 42,3 (C^4), 49,4 (2 x C^{12}), 50,4 et 50,6 (OCH_3), 51,2 (2 x OCH_3), 55,5 et 55,8 (C^2), 68,7, 69,2, 69,3, 69,4, 70,2 et 70,6 (6 x OCH_2), 168,2 et 168,3 (C^1), 172,31 (C^5), 200,9 et 201,0 (C^8)

IR (film, cm^{-1}) : 2949, 2871 (C-H v alk), 2101 (N_3 v), 1735, 1728 (C=O v), 1437 et 1358 (C-H δ), 1280, 1248, 1122 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{O}_8\text{N}_3\text{Na}$: 412,1696, exp : 412,1700

2-(1-acetoxyethylidene)-4-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutarate de diméthyle 3b ($\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9$, 431,44 g/mol)



Une solution du produit **2b** (1,6 g, 4,11 mmol) dans la pyridine distillée (30 mL) est refroidie à 0 °C. On ajoute le chlorure d'acétyle (0,43 mL, 6,2 mmol). Un précipité blanc se forme. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. L' Et_2O (70 mL) est ajouté puis la phase organique est lavée avec de l'eau (50 mL) et une solution aqueuse saturée en CuSO_4 (2 x 50 mL). La phase organique est alors séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/acétate d'éthyle : 6/4). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (1,3 g, **73 %**). On n'observe qu'un seul stéréoisomère.

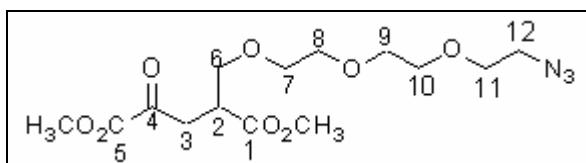
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,13 (3 H, s, H^{16}), 2,22 (3 H, s, H^{14}), 2,45 (1 H, dd, $J = 6,5$ et $13,5 \text{ Hz}$, H^{3a}), 2,49 (1H, dd, $J = 8$ et $13,5 \text{ Hz}$, H^{3b}), 2,73 (1 H, m, H^4), 3,32 (2 H, t, $J = 5,0 \text{ Hz}$, H^{12}), 3,45 (1 H, dd, $J = 9,5$ et $5,6 \text{ Hz}$, H^{6a}), 3,51 (2H, m, OCH_2), 3,54 (3H, m, OCH_2 et H^{6b}), 3,56 à 3,62 (6H, m, 3 x OCH_2), 3,58 (3 H, s, OCH_3), 3,69 (3 H, s, OCH_3)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 19,6 (C^{14}), 20,8 (C^{16}), 26,5 (C^3), 44,9 (C^4), 50,7 (C^{12}), 51,7 et 51,8 (OCH_3), 70,0, 70,4, 70,5, 70,6, 70,7 et 71,4 (6 x OCH_2), 119,2 (C^2), 158,6 (C^{13}), 167,4 (C^1), 168,1 (C^{15}), 174,2 (C^5)

IR (film, cm^{-1}) : 2951, 2871 (C-H v), 2108 (N_3 v), 1761, 1735 (C=O v), 1439 (C=C v), 1373 (C-H δ), 1299, 1212, 1119 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na}$ 454,1801, exp : 454,1806

2-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle 4b
(C₁₄H₂₃N₃O₈, 361,35 g/mol)



Une solution d'acétate d'énol **3b** (3 g, 6,96 mmol) dans CH₂Cl₂ anhydre (100 mL) est refroidie à – 70 °C. On fait buller un mélange d'O₃/O₂ généré par un ozoneur pendant 25 minutes jusqu'à ce qu'une légère coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par un flux d'O₂ pur dans le mélange (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (0,9 mL, 10,4 mmol) est ensuite ajouté puis le milieu est agité pendant 4 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé avec H₂O (100 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 4/6 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (2,1 mg, **83 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,05 (1H, dd, *J* = 18,5 et 5,0 Hz, H^{3a}), 3,24 (1H, m, H²), 3,36 (3H, m, H^{3b} et H¹²), 3,57 (4H, m, 2 x OCH₂), 3,65 (7H, m, 3 x OCH₂ et H^{6a}), 3,67 (3H, s, OCH₃), 3,74 (1H, *J* = 4,6 et 9,5 Hz, H^{6b}), 3,86 (3H, s, OCH₃)

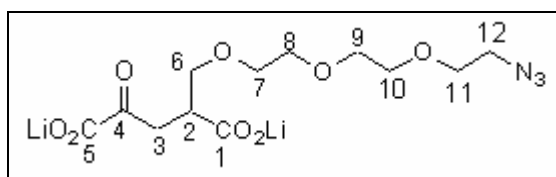
RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 38,15 (C³), 41,2 (C²), 50,7 (C¹²), 52,2 (OCH₃), 53,2 (OCH₃), 70,0, 70,4 (OCH₂), 70,6 (2 x OCH₂), 70,7 (2 x OCH₂), 160,9 (C⁵), 172,6 (C¹), 200,0 (C⁴)

IR (film, cm⁻¹) : 2957, 2916 et 2871 (C-H alk v), 2107 (N₃ v), 1732 (C=O ester v), 1441 et (C-H δ), 1295, 1259 et 1114 (C-O v)

SM (ES⁺) calc pour C₁₄H₂₃N₃O₈Na : 384,1383, exp : 384,1387

Analyses élémentaires : calculées pour C₁₄H₂₃N₃O₈ (%) C : 46,53, H : 6,42, N : 11,63
trouvées (%) C : 46,60, H : 6,39, N : 11,24

2-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-4-oxopentanedioate de dilithium 5b
(C₁₂H₁₇N₃O₈Li₂, 345,16 g/mol)



Le diester **4b** (500 mg, 1,43 mmol) est dissous dans MeOH (8 mL). Une solution aqueuse de LiOH 0,4M (7,5 mL, 3 mmol) fraîchement préparée est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Le pH du milieu est ajusté à pH 7,6 par ajout de résine acide (DOWEX 50WX8). Après filtration et évaporation des solvants, le produit obtenu est isolé sous la forme d'un solide beige (500 mg, **quantitatif**).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 2,94 (2H, m, H² et H^{3a}), 3,08 (1H, dd, *J* = 7,5 et 18,0 Hz, H^{3b}), 3,49 (2H, t, *J* = 5,0 Hz, H¹²), 3,59 (1H, dd, *J* = 6,5 et 10,0 Hz, H^{6a}), 3,65 à 3,72 (11H, m, 5 x OCH₂ et H^{6b})

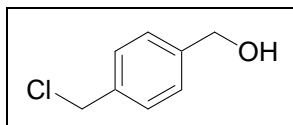
RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 39,3 (C^3), 43,5 (C^2), 50,1 (C^{12}), 69,2 (OCH_2), 69,5 (2 x OCH_2), 69,6 (2 x OCH_2), 71,9 (OCH_2), 169,5 (C^5), 180,6 (C^1), 204,1 (C^4)

IR (KBr, cm^{-1}) : 3415 et 3237 (O-H v), 2937 et 2878 (C-H alk v), 2116 (N_3 v), 1705 et 1679 (C=O ester v), 1422 et 1384 (C-H δ), 1262, 1108 et 1083 (C-O v)

SM (ES-) m/z calc pour $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_8$: 332,1094, exp : 332,1107

*1.5 2-((4-(azidomethyl)benzyloxy)methyl)-4-oxoglutamate de diméthyle **4c***

(4-(chloromethyl)phenyl)methanol 10 ($\text{C}_8\text{H}_9\text{OCl}$, 156,61)

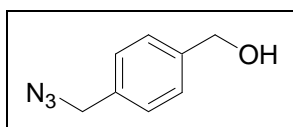


A une suspension de (4-(chloromethyl)phenyl)methanol (5g, 36,18 mmol) dans CHCl_3 (35 mL), est ajoutée goutte à goutte une solution de SOCl_2 (2,9 mL, 39,8 mmol) dans le CHCl_3 (4 mL). Le milieu est fortement agité à Ta pendant 15 h. Une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 (75 mL) est additionnée au milieu réactionnel. La phase aqueuse est ensuite extraite avec AcOEt (3 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant; cyclohexane/ AcOEt : 6/4). Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (4,76 g, **84 %**).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,70 (1H, s élargi, OH), 4,56 (2H, s, CH_2Cl), 4,70 (2H, s, CH_2OH), 7,37 (4H, m, Har).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 46,0 (CH_2Cl), 64,9 (CH_2OH), 127,3 et 128,8 (CHar), 136,9 et 141,1 (Car).

(4-(azidomethyl)phenyl)methanol 9 ($\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$, 163,18 g/mol)



A une suspension du composé **10** (1,0 g, 6,3 mmol) dans H_2O (13 mL), est ajoutée NaN_3 (0,448 g, 6,8 mmol) et NH_4Cl (0,448 g). Le milieu est chauffé à 70 °C pendant 6 h. La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant; cyclohexane/ AcOEt : 6/4). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (0,916 g, **88 %**).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,84 (1H, s élargi, OH), 4,33 (2H, s, CH_2N_3), 4,70 (2H, s, CH_2OH), 7,32 (4H, m, Har).

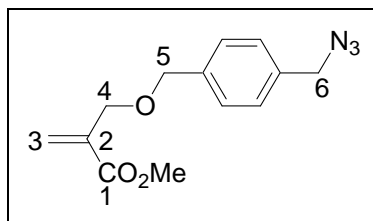
RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 54,5 (CH_2N_3), 64,9 (CH_2OH), 127,4 et 128,5 (CHar), 134,7 et 141,0 (Car).

IR (film, cm^{-1}) : 3349 (O-H v), 2930 et 2876 (C-H alk v), 2099 (N_3 v), 1421 et 1253 (C-H δ), 1043 (C-O v).

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_8\text{H}_9\text{ON}_3$: 163,18 exp : 163.

Analyse élémentaire : calculé pour $C_8H_9ON_3$ (%) C : 58,88, H : 5,56, N : 25,75
trouvé (%) C : 58,75, H : 5,57, N : 25,80.

2-((4-(azidomethyl)benzyloxy)methyl)acrylate de méthyle 1c ($C_{13}H_{15}N_3O_3$, 261,11 g/mol)



Après refroidissement à 0 °C d'une suspension de NaH (0,25 g, 6,7 mmol) dans le THF anhydre (9 mL), on ajoute goutte à goutte une solution du composé **2** (0,90 g, 5,5 mmol) dans le THF anhydre (9 mL). Le milieu est agité 30 min à température ambiante. Cette solution est ensuite additionnée lentement à une solution d'acrylate n° (1g, 5,6 mmol) dans le THF (9 mL) préalablement refroidi à 0 °C. Un précipité blanc apparaît et jaunit au cours de la réaction. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 h. Après neutralisation du milieu par ajout d'acide acétique concentré, on ajoute H₂O (15 mL). La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 9/1 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (1,1 g, **77 %**).

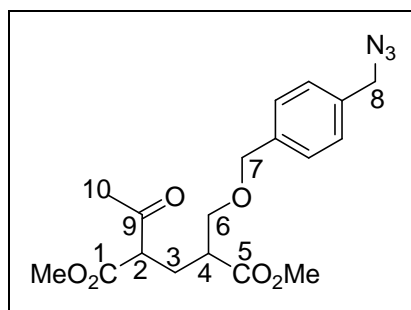
RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 3,80 (3H, s, OCH₃), 4,27 (2H, s, H⁴), 4,36 (2H, s, H⁵), 4,62 (2H, s, H⁶), 5,96 (1H, s, H^{3a}), 6,36 (1H, s, H^{3b}), 7,35 (4H, m, Har).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 51,8 (OCH₃), 54,5 (C⁶), 68,4 (C⁴), 72,3 (C⁵), 126,1 (C³), 128,2 (CHar), 134,8 (Car), 137,0 (C²), 138,3 (Car), 166 (C¹).

IR (film, cm⁻¹) : 3368 (C=CH et C-Har v), 2952 et 2864 (C-Halk v), 2099 (N₃ v), 1723 (C=O v), 1438 (C-H δ), 1096 (C-O v).

SM (ES+) m/z calc pour C₁₃H₁₅O₃ N₃ : 284,0996, exp : 284,1011.

2-acetyl-4-((4-(azidomethyl)benzyloxy)methyl)glutamate de diméthyle 2c ($C_{18}H_{23}N_3O_6$, 377,39 g/mol)



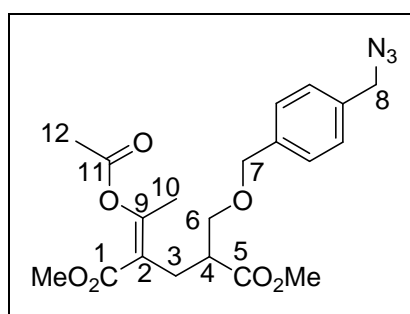
A une solution du composé **1c** (2,3 g, 3,8 mmol) dans MeOH (40 mL), on additionne le fluorure de potassium (16,1 g, 11,4 mmol) puis l'acétoacétate de méthyle (1,0 mL, 5,7 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 68 °C pendant 16 h. Après refroidissement à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec de AcOEt (4 x 70 mL). Les phases organiques

sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; CH_2Cl_2). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (1,3 g, **39** %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,10-2,19 (2 x 2H, m, H^3), 2,22-2,27 (2 x 3H, 2 x s, H^{10}), 2,68 (2 x 1H, m, H^4), 3,59–3,74 (3H, m, H^6 et H^2), 3,70 (2 x 3H, s, 2 x OCH_3), 3,72 (3H, s, OCH_3), 3,73 (3H, s, OCH_3), 4,31 (2 x 2H, s, H^8), 4,49 (2 x 2H, m, H^7), 7,30 (2 x 4H, m, Har).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 26,8 et 29,9 (C^3), 29,0 et 29,5 (C^9), 43,5 et 43,6 (C^4), 51,9 et 52,5 (C^2), 56,8 et 57,2 (OCH_3), 70,3 et 70,7 (C^6), 73,1 (C^7), 127,6, 127,7 et 128,4 (CHar), 137,8 (Car), 169,6 (C^1), 173,7 (C^5), 202,5 (C^8).

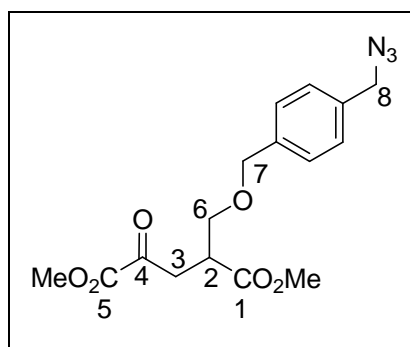
2-(1-acetoxyethyl)-4-((4-(azidomethyl)benzyloxy)methyl)glutamate de diméthyle 3c
($\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_7$, 420,44 g/mol)



Une solution de produit de Michael 2c (0,64 g, 1,7 mmol) dans la pyridine distillée (5 mL) est refroidie à 0 °C. On ajoute le chlorure d'acétyle (0,18 mL, 2,6 mmol). Un précipité blanc se forme. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 48 h. L' Et_2O (10 mL) est ajouté puis la phase organique est lavée avec de l'eau (10 mL) et une solution aqueuse saturée en CuSO_4 (2 x 10 mL). La phase organique est alors séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/ AcOEt : 7/3). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,22 g, **31** %). On n'observe qu'un seul stéréoisomère.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,10 (3 H, s, H^{12}), 2,28 (3 H, s, H^{10}), 2,58 (2 H, m, H^3), 2,82 (1 H, m, H^4), 3,53 (1 H, dd, $J = 5,4$ et $9,2$ Hz, H^{6a}), 3,61 (1 H, dd, $J = 7,2$ et $9,2$ Hz, H^{6b}), 3,67 (3 H, s, OCH_3), 3,74 (3 H, s, OCH_3), 4,32 (2H, s, H^8), 4,48 (2 H, m, H^7), 7,29 (4H, m, Har).

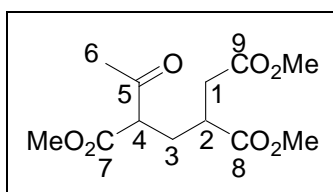
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 19,6 (C^{10}), 20,8 (C^{12}), 26,4 (C^3), 45,0 (C^4), 51,8 (2 x OCH_3), 54,5 (C^8), 70,3 (C^6), 72,6 (C^7), 119,2 (C^2), 127,9 et 128,2 (CHar), 134,6 et 138,4 (Car), 158,7 (C^{11}), 168,0 (C^9), 168,1 (C^1), 174,1 (C^5).

2-((4-(azidométhyl)benzyloxy)méthyl)-4-oxoglutamate de diméthyle 4c (C₁₆H₁₉N₃O₆, 349,34 g/mol)

L'acétate d'énol 3c (0,22 g, 0,54 mmol) est dissous dans un mélange de CH₃CN (2 mL) et de CHCl₃ (2 mL). On ajoute successivement le périodate de sodium (0,46 g, 0,22 mmol), l'oxyde de ruthénium (0,015g, 0,12 mmol) et H₂O (5 mL). Le milieu est ensuite fortement agité à température ambiante pendant 4 h. Le mélange est filtré sur célite. La phase aqueuse est extraite avec du CHCl₃ (10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant; cyclohexane/acétate d'éthyle : 7/3). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (20 mg, **10 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,07 (1H, dd, *J* = 5,0 et 18,0 Hz, H^{3a}), 3,28 (1H, m, H²), 3,42 (1H, dd, *J* = 8,0 et 18,0 Hz, H^{3b}), 3,68-3,73 (2H, m, H⁶), 3,69 (3H, s, OCH₃), 3,83 (3H, s, OCH₃), 4,32 (2H, s, H⁸), 4,49 (2H, s, H⁷), 7,30 (4H, m, Har).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 38,1 (C³), 41,2 (C²), 52,6 et 53,0 (OCH₃), 54,5 (C⁸), 69,6 (C⁶), 72,6 (C⁷), 127,0 et 128,3 (CHar), 134,9 et 137,9 (Car), 160,9 (C⁵), 172,5 (C¹), 191,9 (C⁴).

*1.6 Synthèse de l'acide 4-oxobutane-1,2,4-tricarboxylate de lithium 5d***5-oxohexane-1,2,4-tricarboxylate de triméthyle 2d (C₁₂H₁₈O₇, 274,27 g/mol)**

A une solution d'itaconate de diméthyle (5g ; 31,16 mmol) dans le MeOH (50 mL) on ajoute du KF (5,3 g ; 94,8 mmol) et de l'acétoacétate de méthyle (5,71 mL ; 6,15 g ; 53 mmol). Le mélange réactionnel est porté au reflux du MeOH (65°C) pendant 2 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL), puis extrait avec AcOEt (2 × 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant : cyclohexane/AcOEt : 7/3). On obtient le produit sous la forme d'une huile qui cristallise après quelques heures (5, 22g, Rd = **78 %**).

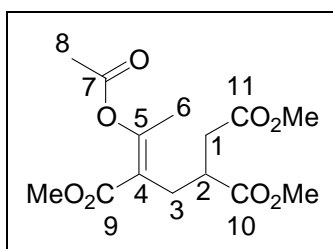
RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 2,00-2,14 (2 x 2H, m, H^3), 2,21 et 2,24 (3H, s, H^6), 2,32-2,58 (2 x 2H, m, H^1), 2,62-2,78 (2 x 1H, m, H^2), 3,57-3,61 (2 x 1H, m, H^4), 3,63 (2 x 3H, s, OCH_3), 3,65 et 3,66 (3H, s, OCH_3), 3,71 et 3,73 (3H, s, OCH_3).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 29,5 et 29,8 (C^6), 28,5 et 29,7 (C^3), 35,9 et 36,3 (C^1), 38,9 et 39,1 (C^2), 51,7 (2 x OCH_3), 51,75, 51,8, 52,0 et 52,6 (OCH_3), 56,6 et 57,3 (C^4), 169,3 et 169,4 (C^8), 171,6 et 171,7 (C^7), 174,2 (C^9), 201,7 et 201,9 (C^5).

IR (film, cm^{-1}) : 3004 et 2956 (C-H v), 1737 (C=O v), 1439 et 1364 (C-H δ), 1254, 1202 et 1165 (C-O v).

SM (ES-) m/z : calc pour $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{Na}$: 297,0950, exp : 297,0935.

trimethyl 5-acetoxylhex-4-ene-1,2,4-tricarboxylate de triméthyle 3d ($\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_8$, 316,30 g/mol)



A une solution du composé 2d (5 g, 23,34 mmol) dans la pyridine (50 mL), est ajouté à 0°C du chlorure d'acétyle (2,5 mL, 35,02 mmol). La solution est agitée 3 heures à Ta, sous argon. La solution est alors diluée dans 50 mL d'éther, lavée avec 75 mL d'une solution aqueuse saturée en CuSO_4 , puis avec H_2O (50mL). La phase aqueuse est extraite avec Et_2O (3x60 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , puis concentrées sous pression réduite. Après purification par chromatographie éclair (éluant cyclohexane/ AcOEt 7/3), le produit est obtenu sous forme d'une huile incolore (6,3 g, **86 %**).

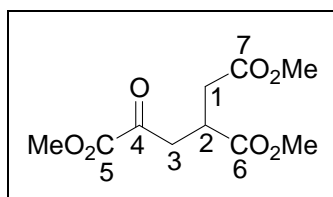
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,17 (3H, s, H^8), 2,26 (3H, s, H^6), 2,42 (2H, m, H^{1a} et H^{3a}), 2,63 (2H, m, H^{1b} et H^{3b}), 2,92 (1H, m, H^2), 3,62 (3H, s, OCH_3), 3,63 (3H, s, OCH_3), 3,73 (3H, s, OCH_3).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 19,6 et 20,8 (C^6 et C^8), 29,1 (C^3), 35,0 (C^1), 40,2 (C^2), 51,7, 51,8 et 51,9 (OCH_3), 118,8 (C^4), 159,1 (C^5), 167,2 et 167,9 (C^9 et C^{10}), 172,1 (C^7), 174,5 (C^{11}).

IR (film, cm^{-1}) : 3034 et 2954 (C-H v), 1760-1715 (C=O v), 1454 et 1369 (C-H δ), 1209, 1218 et 1166 (C-O v).

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{Na}$: 339,1056, exp : 339,1057.

4-oxobutane-1,2,4-tricarboxylate de triméthyl 4d ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_7$, 246,21 g/mol)



Le composé 3d (4g ; 12,64 mmol) est repris dans 30 mL de CH_2Cl_2 fraîchement distillé. Un mélange de O_2/O_3 est alors introduit dans le milieu réactionnel pendant 3 h 30 à - 78 °C,

jusqu'à ce que la solution soit bleue. Après retour à Ta, Me₂S (1,4 mL, 18,97 mmol) est ajouté. La solution est agitée jusqu'à disparition des ozonides. Le milieu est lavé avec H₂O (20 mL), puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl (20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Après purification par chromatographie éclair (éluant : AcOEt), le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (2,24g, **72 %**).

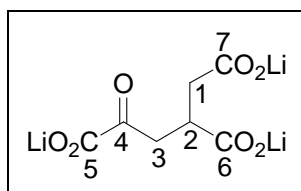
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,58 (1H, dd, *J* = 6,8 et 16,8 Hz, H^{1a}), 2,73 (1H, dd, *J* = 5,7 et 16,8 Hz, H^{1b}), 3,02 (1H, dd, *J* = 3,4 Hz et 16,5 Hz, H^{3a}), 3,35 (2H, m, H^{3b} et H²), 3,64 (6H, s, 2 x OCH₃), 3,84 (3H, s, OCH₃).

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 34,8 (C¹), 36,1 (C²), 39,9 (C³), 51,9, 52,4 et 53,1 (OCH₃), 160,1 (C⁵), 171,6 et 173,2 (C⁶ et C⁷), 191,5 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 2956 (C-H v), 1754 (C=O v), 1440 et 1363 (C-H δ), 1264, 1204 et 1167 (C-O v).

SM (ES+) *m/z* calc pour C₁₀H₁₄O₇Na : 269,0634, exp : 269,0637

4-oxobutane-1,2,4-tricarboxylate de lithium **5d** (C₇H₅O₇Li₃, 221,93 g/mol)



A une solution de **4d** (0,38 g, 1,43 mmoles) dans 12,35 mL méthanol on ajoute goutte à goutte le même volume d'une solution de lithine 0,4 M (4,94 mmoles, 3,45 eq). La solution est agitée sous argon pendant 18 heures. La lithine en excès est alors neutralisée et éliminée par ajout de résine acide (Dowex 50 w×8, H⁺), qui est ensuite filtrée. La solution est alors concentrée sous pression réduite. On obtient 0,33 g d'un solide blanc (p = 100 %).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 2,28 (1H, dd, *J* = 8,6 et 15,3 Hz, H²), 2,56 (1H, dd, *J* = 8,6 et 15,3 Hz, H^{1a}), 2,84 (1H, dd, *J* = 5,0 et 16,4 Hz, H^{1b}), 2,94 (1H, m, H^{3a}), 3,00 (1H, dd, *J* = 5,9 et 16,4 Hz, H^{3b}).

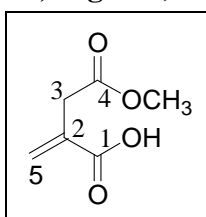
RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ 40,1 (C¹), 40,5 (C³), 41,1 (C²), 168,4 (C⁵), 179,6 et 181,6 (C⁷ et C⁶), 202,6 (C⁴).

IR (KBr, cm⁻¹) : 3420 (O-H v), 1715 et 1641 (C=O v), 1419 (C-H δ), 1108 (C-O v).

SM (ES-) *m/z* : calc pour C₇H₆O₇Li : 209,0274, exp : 209,0274.

1.7 Synthèse de l'acide 2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-4-oxoglutarate de dilithium **5e**

itaconate de 4-méthyle **11** (C₆H₈O₄, 144,13 g/mol)

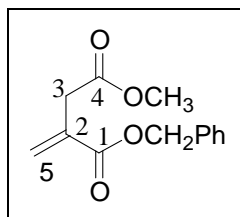


Une solution d'anhydride itaconique (6 g, 53,5 mmol) dans 27 mL de MeOH est chauffée à 65 °C pendant 30 heures. Le méthanol est ensuite évaporé pour donner un solide blanc (7,64 g, **99 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,56 (2H, s, H^3), 3,89 (3H, s, OCH_3), 5,18 (1H, s élargi, OH), 5,98 (1H, s, H^{5a}), 6,51 (1H, s, H^{5b}).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 36,8 (C^3), 50,8 (OCH_3), 127,4 (C^2), 134,3 (C^5), 167,0 (C^1), 172,7 (C^4).

itaconate de 4-méthyle et de 1-benzyle 1e ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$, 234,25 g/mol)



Le DBU (1,8 diazobicyclo[5.4.0]undec-7-ène, 5,46 mL, 36,2 mmol) est ajouté à une solution d'itaconate de 4-méthyle **11** (5,22 g, 36,2 mmol) dans le toluène (26 mL). On ajoute goutte à goutte, le bromure de benzyle (4,3 mL, 36,2 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 70 minutes. Il est ensuite lavé avec une solution de HCl 3N (20 mL), avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 (20 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est isolé sous la forme d'une huile incolore (8,08 g, **95 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,36 (2H, s, H^3), 3,64 (3H, s, OCH_3), 5,21 (2H, s, OCH_2Ph), 5,73 (1H, s, H^{5a}), 6,38 (1H, s, H^{5b}), 7,35 (5H, m, Har).

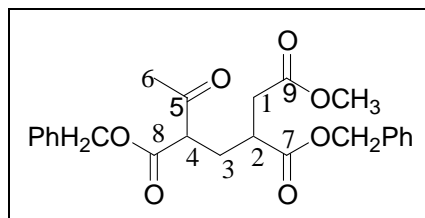
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 37,6 (C^3), 52,0 (OCH_3), 66,8 (OCH_2Ph), 128,1, 128,2 et 128,5 (CHar), 128,9 (C^5), 133,7 (C^2), 135,8 (Car), 165,9 (C^1), 171,1 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3033 et 2952 (C-H v), 1732 (C=O v), 1641 (C=C v), 1366 (C-H δ), 1199 (C-O v).

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Na}$: 257,0790, exp : 257,0784.

Analyses élémentaires : calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (%) C : 66,65, H : 6,02
trouvé (%) C : 66,70, H : 6,21.

5-oxohexane-1,2,4-tricarboxylate de 2,4-dibenzyle et de 1-méthyle 2e ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7$, 426,46 g/mol)



A une solution du composé **1e** (4 g, 17,1 mmol) dans le DMSO (15 mL), on additionne le fluorure de potassium (2,96 g, 51 mmol) puis l'acétoacétate de benzyle (3,5 mL, 20,4 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 68 °C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL) est ajoutée au mélange

réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (4 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (4,75 g, **66 %**).

On observe par RMN la présence des diastéréoisomères dans un rapport 1/1.

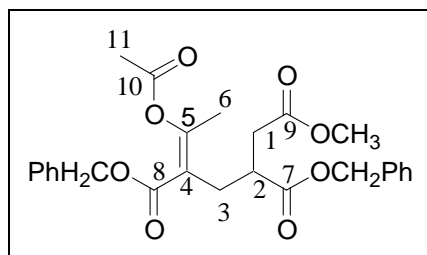
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,05-2,21 (2 x 2H, m, H^3), 2,09 (3H, s, H^6), 2,13 (3H, s, H^6), 2,47 (1H, dd, $J = 16,4$ et 5 Hz, H^{1a}), 2,50 (1H, dd, $J = 16,4$ et 5 Hz, H^{1a}), 2,72 (1H, dd, $J = 8,8$ et 16,4 Hz, H^{1b}), 2,74 (1H, dd, $J = 8,8$ et 16,4 Hz, H^{1b}), 2,86 (2 x 1H, m, H^2), 3,60 (2 x 3H, s, OCH_3), 3,62 (2 x 1H, m, H^4), 5,13 (4 x 2H, m, OCH_2Ph), 7,34 (4 x 5H, m, Har)

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 29,0 et 29,7 (C^6), 29,5 et 29,6 (C^3), 36,1 et 36,4 (C^1), 39,1 et 39,3 (C^2), 51,8 (2 x OCH_3), 56,6 et 57,3 (C^4), 66,8 et 67,4 (2 x OCH_2Ph), 127,9 à 128,6 (CHar), 135,0, 135,1 et 135,6 (Car), 168,6 et 168,8 (C^8), 171,60 et 171,63 (C^7), 173,6 (C^9), 201,7 et 201,8 (C^5).

IR (film, cm^{-1}) : 3033 et 2952 (C-H v), 1745 et 1712 (C=O v), 1643 (C=C v), 1248,7 et 1158,5 (C-O v), 749 et 699 (C-Har δ).

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{Na}$: 449,1566, exp : 449,1576.

5-acetoxylhex-4-ene-1,2,4-tricarboxylate de 2,4-dibenzyle et de 1-méthyle 3e ($\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_8$, 468,5 g/mol)



Une solution de produit 2e (9,9 g, 23,2 mmol) dans la pyridine distillée (50 mL) est refroidie à 0 °C. On ajoute le chlorure d'acétyl (2,5 mL, 35,02 mmol). Un précipité blanc se forme. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. L' Et_2O (50 mL) est ajouté puis la phase organique est lavée avec de l'eau (75 mL) et une solution aqueuse saturée en CuSO_4 (2 x 50 mL). La phase organique est alors séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (8,7 g, **86 %**). On n'observe qu'un seul stéréoisomère.

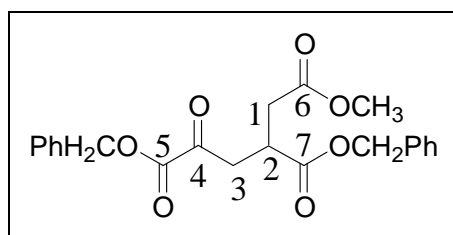
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,17 (3H, s, H^{11}), 2,28 (3H, s, H^6), 2,50 (2H, m, H^{1a} et H^{3a}), 2,70 (2H, m, H^{1b} et H^{3b}), 3,05 (1H, m, H^2), 3,60 (3H, s, OCH_3), 5,07 (2H, s, OCH_2Ph), 5,20 (2H, s, OCH_2Ph), 7,31 (10H, m, Har).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 19,7 et 20,8 (C^6 et C^{11}), 29,3 (C^3), 35,0 (C^1), 40,4 (C^2), 51,6 (OCH_3), 66,6 et 66,8 (OCH_2Ph), 118,8 (C^4), 128,1, 128,3, 128,5, 128,6 (CHar), 135,6 et 135,8 (Car), 159,5 (C^5), 166,6 et 167,9 (C^8 et C^{10}), 172,0 (C^7), 177,4 (C^9).

IR (film, cm^{-1}) : 3034 et 2954 (C-H v), 1735 (C=O v), 1454 et 1369 (C-H δ), 1270, 1218 et 1166 (C-O v), 749 et 699 (C-Har δ).

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{Na}$: 491,1682, exp : 491,1692.

Analyse élémentaire : calculé pour $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_8$ (%) C : 66,70, H : 6,02, O : 27,32
trouvé (%) C : 66,62, H : 6,23, O : 27,39.

4-oxobutane-1,2,4-tricarboxylate de 2,4-dibenzyle et 1-méthyle 4e (C₂₂H₂₂O₇, 398,41 g/mol)

Une solution d'acétate d'énol 3e (1,2 g 2,56 mmol) dans CH₂Cl₂ anhydre (20 mL) est refroidie à - 70 °C. On fait buller un mélange d'O₃/O₂ généré par un ozoneur pendant 25 minutes jusqu'à ce qu'une légère coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par un flux d'O₂ pur dans le mélange (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (0.35 mL, 3,8 mmol) est ensuite ajouté puis le milieu est agité pendant 4 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé avec H₂O (20 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (745 mg, **73 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,65 (1H, dd, *J* = 6,4 et 16,8 Hz, H^{1a}), 2,79 (1H, dd, *J* = 5,6 et 16,8 Hz, H^{1b}), 3,11 (1H, dd, *J* = 8,0 Hz et 20,9 Hz, H^{3a}), 3,44 (2H, m, H^{3b} et H²), 3,65 (3H, s, OCH₃), 5,13 (2H, m, OCH₂Ph), 5,29 (2H, s, OCH₂Ph), 7,36 (10H, m, Har).

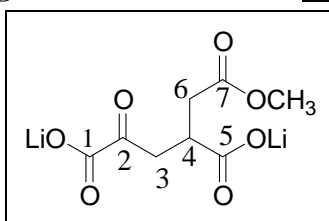
RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 35,0 (C¹), 36,5 (C²), 40,1 (C³), 52,0 (OCH₃), 67,3 et 68,3 (OCH₂Ph), 128,4, 128,5, 128,7, 128,80, 128,85, 128,9 (CHar), 134,5 et 135,5 (Car), 160,2 (C⁵), 171,6 et 172,7 (C⁶ et C⁷), 191,6 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 3034 et 2954 (C-H v), 1736 et 1644 (C=O v), 1440 et 1363 (C-H δ), 1254, 1212 et 1163 (C-O v), 750 et 699 (C-Har δ).

SM (ES+) *m/z* calc pour C₂₂H₂₂O₇Na 421,1263, exp : 421,1270.

Analyse élémentaire : calculé pour C₂₂H₂₂O₇ (%) C : 66,32, H : 5,57

trouvé (%) C : 66,33, H : 5,82.

2-(2-methoxy-2-oxoethyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5e (C₈H₈O₇Li₂, 230,03 g/mol)

A une solution de produit benzylé 4e (700 mg, 1,8 mmol) dans le MeOH (8 mL), est additionné du Pd/C à 10 % (143 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 20 min à température ambiante sous une atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur membrane millipore et évaporation du solvant, le résidu est repris dans H₂O (15 mL). Le pH de la solution est ajusté à 7,6 par addition d'une solution de LiOH à 0,2 M (environ 18 mL). Après évaporation de H₂O, le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (390 mg, **96 %**).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 2,16 (1H, dd, $J = 14,5$ et $9,1$ Hz, H^{6a}), 2,17 (1H, m, H^4), 2,51 (1H, dd, $J = 14,5$ et $5,2$ Hz, H^{6b}), 2,90 (2H, m, H^3).

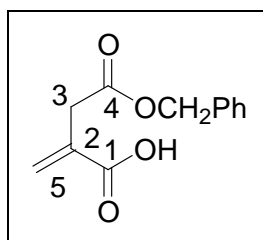
RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 39,9 (C^6), 40,5 (C^4), 41,2 (C^3), 169,5 (C^1), 180,7 (C^7), 181,4 (C^5), 198,5 (C^2).

IR (KBr, cm^{-1}) : 3426 (O-H v), 2990 (C-H v), 1725 et 1603 (C=O v), 1421 (C-H δ), 1227 (C-O v).

SM (ES-) m/z : calc pour $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_7$: 217,0348, exp : 217,0351.

I.8 Synthèse de l'acide 6-methoxy-3-(methoxycarbonyl)-5,6-dioxohexanoïque 4i

itaconate de 4-benzyle 12 ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$, 220,22 g/mol)



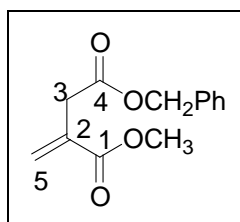
Une solution d'anhydride itaconique (5,4 g, 48 mmol) dans BnOH distillé (5 mL, 48 mmol) est chauffée à 100°C pendant 7 h. Une fois le milieu refroidi, le produit cristallise sous la forme d'un solide blanc (10,6 g, **quantitatif**).

m.p = $77-82^\circ\text{C}$.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,42 (2H, s, H^3), 5,18 (2H, s, OCH_2Ph), 5,86 (1H, s, H^{5a}), 6,50 (1H, s, H^{5b}), 7,37 (5H, m, Har), 9,01 (1H, s élargi, OH).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 37,3 (C^3), 66,8 (OCH_2Ph), 128,2, 128,3 et 128,6 (CHar), 130,9 (C^5), 133,1 (C^2), 135,6 (Car), 170,4 et 171,3 (C^1 et C^4).

itaconate de 1-méthyle et de 4-benzyle 1f ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$, 234,25 g/mol)



Le DBU (7,3 mL, 49 mmol) est ajouté à une solution d'itaconate de 4-benzyle 12 (9,26 g, 42 mmol) dans le toluène (55 mL). On ajoute goutte à goutte, une solution d'iodure de méthyle (5,6 mL, 90 mmol) dans le toluène (15 mL). Le milieu est agité à température ambiante pendant 24 heures. Il est ensuite lavé avec une solution de HCl 1N (100 mL), avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 (100 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; AcOEt/ cyclohexane : 2/8). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (7,8 g, **79 %**).

Les analyses RMN montrent que le produit contient 10 % d'itaconate de 1-benzyle et de 4-méthyle.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,39 (2H, s, H^3), 3,71 (3H, s, OCH_3), 5,14 (2H, s, OCH_2Ph), 5,71 (1H, s, H^{5a}), 6,33 (1H, s, H^{5b}), 7,34 (5H, m, Har).

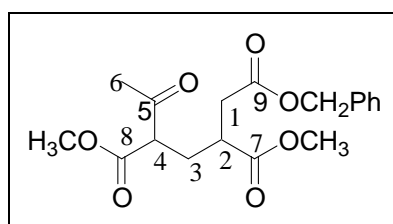
RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 37,7 (C^3), 52,1 (OCH_3), 66,7 (OCH_2Ph), 128,2, 128,3 et 128,5 (CHar), 128,6 (C^5), 133,6 (C^2), 135,8 (Car), 167,0 (C^1), 170,5 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3065 et 2995 (C-H v), 1730 (large C=O v), 1638 (C=C v), 1440 et 1379 (C-H δ), 1258 et 1136 (C-O v), 749 et 699 (C-Har δ)

SM (ES+) : calc pour $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Na}$: 257,0790, exp : 257,0794.

Analyse élémentaire : calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (%), C : 66,65, H : 6,02
trouvé (%) C : 66,47, H : 6,15.

5-oxohexane-1,2,4-tricarboxylate de 1-benzyle et de 2,4-diméthyle 2f ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_7$, 350,36 g/mol)



A une solution du composé **1f** (0,49 g, 2,25 mmol) dans le DMSO (5 mL), on additionne le fluorure de potassium (0,39 g, 6,75 mmol) puis l'acétoacétate de méthyle (0,3 mL, 2,7 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 68 °C pendant 2 h 30. Après refroidissement à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NaCl (25 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (4 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (630 mg, **80 %**).

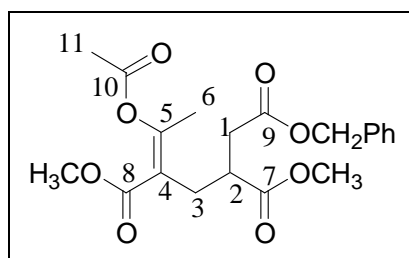
On observe par RMN la présence des diastéréoisomères dans un rapport 1/1.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,00-2,20 (2 x 2H, m, H^3), 2,23 (3H, s, H^6), 2,26 (3H, s, H^6), 2,49 – 2,57 (2 x 2H, m, H^{1a}), 2,70-2,85 (2 x 2H, m, H^{1b} et H^2), 3,60 (2 x 1H, m, H^4), 3,61, 3,63, 3,71 et 3,74 (4 x 3H, s, OCH_3), 5,10 (2H, m, OCH_2Ph), 7,34 (5H, m, Har).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 28,6 et 29,5 (C^3), 29,0 et 29,8 (C^6), 36,3 et 36,6 (C^1), 39,0 et 39,3 (C^2), 52,0 et 52,6 (OCH_3), 56,6 et 57,3 (C^4), 66,6 (OCH_2Ph), 128,3 et 128,6 (CHar), 135,6 (Car), 169,3, 169,4, 171,0, 171,1, 174,1 (C^7 , C^8 et C^9), 201,8 et 202,0 (C^6).

IR (film, cm^{-1}) : 3005 et 2955 (C-H v), 1736 (C=O v), 1440 et 1360 (C-H δ), 1254, 1212 et 1161 (C-O v), 750 et 700 (C-Har δ).

SM (ES+) calc pour $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{Na}$: 373,1283, exp : 373,1287.

5-acetoxyhex-4-ene-1,2,4-tricarboxylate de 1-benzyle et de 2,4-diméthyle 3f (C₂₀H₂₄O₈, 392,40 g/mol)

Une solution de produit de Michael 2f (2,6 g, 7,42 mmol) dans la pyridine distillée (20 mL) est refroidie à 0 °C. On ajoute le chlorure d'acétyle (0,79 mL, 11,1 mmol). Un précipité blanc se forme. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. L'Et₂O (30 mL) est ajouté puis la phase organique est lavée avec de l'eau (20 mL) et une solution aqueuse saturée en CuSO₄ (2 x 20 mL). La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 7/3). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (2,1 g, **72** %).

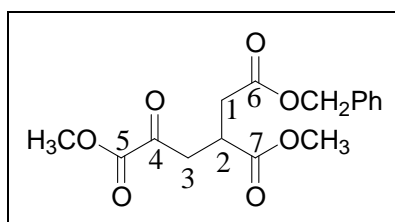
Isomère majoritaire :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,17 (3H, s, H¹¹), 2,27 (3H, s, H⁶), 2,49 (1H, dd, *J* = 7,8 et 13,9 Hz, H^{3a} ou H^{1a}), 2,52 (1H, dd, *J* = 5,0 et 17,2 Hz, H^{3a} ou H^{1a}), 2,66 (1H, dd, *J* = 7,2 Hz et 13,8 Hz, H^{1b} ou H^{3b}), 2,75 (1H, dd, *J* = 9,1 Hz et 17,0 Hz, H^{1b} ou H^{3b}), 3,00 (1H, m, H²), 3,74 (3H, s, OCH₃), 3,61 (3H, s, OCH₃), 5,11 (2H, m, AB, OCH₂Ph), 7,35 (5H, m, Har).

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 19,8 (C¹¹), 21,0 (C⁹), 29,4 (C³), 35,4 (C¹), 40,4 (C²), 52,0 (OCH₃), 66,6 (OCH₂Ph), 118,8 (C⁴), 128,4 et 128,6 (CHar), 135,5 (Car), 159,4 (C⁵), 167,4, 168,1, 171,7 et 174,7 (C⁷, C⁸, C⁹ et C¹⁰).

IR (film, cm⁻¹) : 3034 et 2952 (C-H v), 1731 (C=O v), 1650 (C=C v), 1453 et 1374 (C-H δ), 1163 (C-O v), 749 (C-Har δ).

SM (ES+) calc pour C₂₀H₂₄O₈Na : 387,1427, exp : 387,1420.

4-oxobutane-1,2,4-tricarboxylate de 1-benzyle et de 2,4-diméthyle 4f (C₁₆H₁₈O₇, 322,31 g/mol)

Une solution d'acétate d'énol 3f (0,187 g, 0,48 mmol) dans CH₂Cl₂ anhydre (5 mL) est refroidie à - 70 °C. On fait buller un mélange d'O₃/O₂ généré par un ozoneur pendant 35 minutes jusqu'à ce qu'une légère coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par un flux d'O₂ pur dans le mélange (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (0,05 mL, 0,6 mmol) est ensuite ajouté puis le milieu est agité pendant 4 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé avec H₂O (10 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/acétate d'éthyle : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (152 mg, **98** %).

Isomère majoritaire :

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,67 (1H, dd, $J = 6,4$ et $16,7$ Hz, H^{1a}), 2,82 (1H, dd, $J = 5,1$ et $16,7$ Hz, H^{1b}), 3,05 (1H, dd, $J = 8,0$ Hz et $21,1$ Hz, H^{3a}), 3,37-3,44 (2H, m, H^2 et H^{3b}), 3,64 (3H, s, OCH_3), 3,87 (3H, s, OCH_3), 5,13 (2H, s, OCH_2Ph), 7,34 (5H, m, Har).

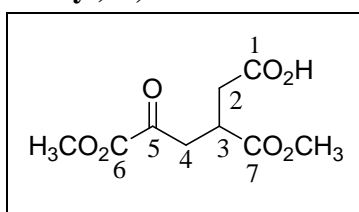
RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 35,1 (C^1), 36,3 (C^2), 40,0 (C^3), 52,4 et 53,1 (OCH_3), 66,7 (OCH_2Ph), 128,3, 128,4 et 128,6 (CHar), 135,5 (Car), 160,7 (C^5), 170,9 et 173,2 (C^6 et C^7), 191,4 (C^4).

IR (film, cm^{-1}) : 3033 et 2956 (C-H v), 1736 (C=O v), 1439 et 1389 (C-H δ), 1264 et 1165 (C-O v), 750 et 701 (C-Har δ).

SM (ES $^+$) calc pour $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_7\text{Na}$: 345,0962, exp : 345,0950.

Analyse élémentaire : calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_7$ (%) C : 59,62, H : 5,62
trouvé (%) C : 59,93, H : 5,79.

Acide 6-methoxy-3-(methoxycarbonyl)-5,6-dioxohexanoïque 4j ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_7$, 232,19 g/mol)



A une solution de produit benzylé 4f (980 mg, 3,04 mmol) dans MeOH (40 mL), est additionné du Pd/C à 10 % (150 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 50 min à température ambiante sous une atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur célite et évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt/AcOH : 50/50/1). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (407 mg, **58 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,70 (1H, dd, $J = 6,6$ Hz et $17,3$ Hz, H^{2a}), 2,83 (1H, dd, $J = 5,9$ Hz et $17,3$ Hz, H^{2b}), 3,08 (1H, dd, $J = 5,1$ Hz et $18,0$ Hz, H^{4a}), 3,37 (1H, m, H^3), 3,43 (1H, dd, $J = 7,2$ Hz et $18,0$ Hz, H^{4b}), 3,72 (3H, s, OCH_3), 3,90 (3H, s, OCH_3).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 34,7 (C^2), 35,9 (C^3), 39,8 (C^4), 52,5 et 53,2 (OCH_3), 160,7 (C^6), 173,1 (C^7), 176,6 (C^1), 191,4 (C^5).

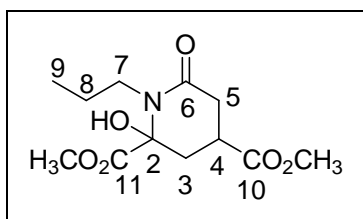
IR (film, cm^{-1}) : 3500-2500 (O-H v), 2959 (C-H alkyles v), 1730 (C=O v), 1441 et 1405 (C-H δ), 1261 et 1166 (C-O v).

SM (ES $^+$) calc pour $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_7\text{Na}$: 255,0481, exp : 255,0488.

Analyse élémentaire : calculé pour $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_7$, $\frac{1}{4} \text{H}_2\text{O}$ (%) C : 45,67, H : 5,32
trouvé (%) C : 45,71, H : 5,45.

1.9 2-hydroxy-6-oxo-1-propylpiperidine-2,4-dicarboxylate de dilithium 5k

2-hydroxy-6-oxo-1-propylpiperidine-2,4-dicarboxylate de diméthyle 4k ($\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_6$, 273,28 g/mol)



L'acide carboxylique **4j** (0,108 g, 0,46 mmol) est dissous dans Et₂O anhydre (5 mL). Après refroidissement du milieu à -10 °C, on ajoute l'IBCF (Chloroformate d'isobutyle, 0,067 mL, 0,51 mmol) et le NMM (N-méthylmorpholine, 0,056 mL, 0,51 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 1 h. Après refroidissement du milieu à -10 °C, la propylamine (0,042 mL, 0,50 mmol) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu est agité toute une nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu est repris dans AcOEt (30 mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique à 5 % (20 mL), H₂O (20 mL), une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (20 mL) et avec H₂O (20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 6/4). Les deux diastéréoisomères sont isolés. L'un se présente sous la forme d'une huile incolore (diastéréoisomère B, 29 mg, **23%**) et le second sous la forme d'un solide blanc (diastéréoisomère A, 43 mg, **34 %**).

diastéréoisomère A

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 0,84 (3H, t, *J* = 7,4 Hz, H⁹), 1,53 (1H, m, H^{8a}), 1,62 (1H, m, H^{8b}), 2,26 (2H, m, H^{3 ou 5}), 2,57 (1H, dd, *J* = 17,5 et 11,7 Hz, H^{3ax ou 5ax}), 2,69 (1H, dd, *J* = 5,6 et 17,7 Hz, H^{3eq ou 5eq}), 2,93 (1H, ddd, *J* = 5,4, 10, 9 et 13,6 Hz, H^{7a}), 3,14 (1H, m, H⁴), 3,26 (1H, ddd, *J* = 5,1, 10,9 et 13,5 Hz, H^{7b}), 3,71 (3H, s, OCH₃), 3,82 (3H, s, OCH₃).

RMN ¹³C (100MHz, CD₃OD) δ 12,0 (C⁹), 22,6 (C⁸), 35,7 (C^{3 ou 5}), 35,9 (C⁴), 38,3 (C^{3 ou 5}), 46,6 (C⁷), 52,9 (OCH₃), 54,0 (OCH₃), 88,0 (C²), 171,6 (C^{6 ou 11}), 173,0 (C^{6 ou 11}), 174,7 (C¹⁰).

IR (KBr, cm⁻¹) 3226 (O-H v), 2957 et 2853 (C-H v), 1751 et 1626 (C=O v), 1457, 1431 et 1411 (C-H δ), 1247 et 1101 (C-O v).

SM (ES+) *m/z* calc pour C₁₂H₁₉NO₆Na : 296,1110, exp : 296,1125.

Analyse élémentaire : calculé pour C₁₂H₁₉NO₆ (%) : C : 52,74, H : 7,00, O : 5,12

trouvé (%) C : 52,86, H : 7,16, O : 5,08.

diastéréoisomère B

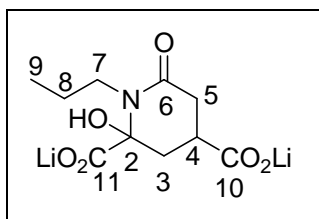
RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ 0,85 (3H, t, *J* = 7,4 Hz, H⁹), 1,55 (1H, m, H⁸), 2,06 (1H, t, *J* = 12,1 Hz, H^{3ax ou 5ax}), 2,50 (1H, dd, *J* = 3,2 et 14,0 Hz, H^{3eq ou 5eq}), 2,61 (2H, m, H^{3 ou 5}), 2,86 (1H, m, H^{7a}), 2,98 (1H, m, H⁴), 3,44 (1H, m, H^{7b}), 3,69 (3H, s, OCH₃), 3,81 (3H, s, OCH₃).

RMN ¹³C (100MHz, CD₃OD) δ 11,8 (C⁹), 22,9 (C⁸), 34,8 (C^{3 ou 5}), 35,7 (C⁴), 38,1 (C^{3 ou 5}), 46,6 (C⁷), 52,7 (OCH₃), 53,8 (OCH₃), 87,9 (C²), 171,4, 173,0 et 174,5 (C⁶, C¹⁰ et C¹⁰).

IR (film, cm⁻¹) 3643 et 3427 (O-H v), 2964 (C-H v), 1736 et 1649 (C=O v), 1444, 1412 et 1378 (C-H δ), 1268 et 1207 (C-O v)

SM (ES+) *m/z* calc pour C₁₂H₁₉NO₆Na : 296,1110, exp : 296,1114

2-hydroxy-6-oxo-1-propylpiperidine-2,4-dicarboxylate de dilithium **5k** (C₁₀H₁₃NO₆Li₂, 257,10 g/mol)



Le diastéréoisomère A du composé **4k** (40 mg, 0,15 mmol) est dissous dans MeOH (0,8 mL). Une solution aqueuse de LiOH 0,4M (0,8 mL, 0,31 mmol) fraîchement préparée est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Le pH

du milieu est ajusté à 7,6 par ajout de résine acide (Dowex 50WX8 H⁺). Après filtration et évaporation des solvants, le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (30 mg, **80 %**).

On observe la présence de diastéréoisomère (A et B) dans un rapport 7/3.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 0,75 (2 x 3H, t, *J* = 7,2 Hz, H⁹), 1,47 (2 x 2H, m, H⁸), 1,88 (1H, t, *J* = 12,5 Hz, H^{3ax} ou ^{5ax}, dia B), 2,05 (2H, d, *J* = 8,2 Hz, H³ ou ⁵, dia. A), 2,24 (1H, m, H^{3éq} ou ^{5éq}, dia. B), 2,41 (2 x 1H, m, H³ ou ⁵, dia. A et dia. B), 2,52 (2 x 1H, m, H³ ou ⁵ dia A et B), 2,82 (2 x 2H, m, H⁴ et H^{7a}, dia. A et B), 3,17 (1H, m, H^{7b}, dia. A), 3,29 (1H, m, H^{7b}, dia. B).

RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) δ 10,8 (C⁹), 21,0 et 21,4 (C⁸), 34,9 et 35,5 (C⁵ ou ³), 36,6 et 37,58 (C⁴), 37,62 et 37,95 (C⁵ ou ³), 45,9 et 47,2 (C⁷), 87,8 et 88,1 (C²), 172,8, 173,1, 176,2, 181,4 et 181,5 (C⁶ et C¹¹).

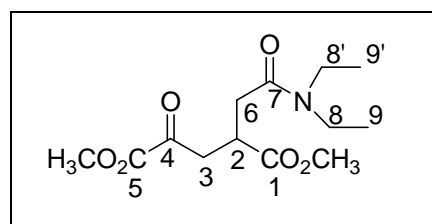
IR (KBr, cm⁻¹) : 3427 (O-H v), 2985 (C-H v), 1628, 1586 (C=O v), 1402 (C-H δ), 1093 (C-O v).

SM (ES-) *m/z* calc pour C₁₀H₁₃NO₆Li : 250,0913, exp : 250,0903

calc pour C₁₀H₁₄NO₆ : 244,0821, exp : 244, 0827.

1.10 2-(2-(diéthylamino)-2-oxoethyl)-4-oxoglutamate de dilithium 5l

2-(2-(diéthylamino)-2-oxoethyl)-4-oxoglutamate de diméthyle 4l (C₁₃H₂₁NO₆, 287,14 g/mol)



L'acide carboxylique **4i** (0,104 g, 0,45 mmol) est dissous dans CH₂Cl₂ anhydre (5 mL). Après refroidissement du milieu à -10 °C, on ajoute l'IBCF (0,087 mL, 0,67 mmol) et le NMM (0,074 mL, 0,67 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 1 h. Après refroidissement du milieu à -10 °C, la diéthylamine (0,07 mL, 0,405 mmol) est ajoutée goutte à goutte. Le milieu est agité toute une nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu est repris dans AcOEt (20 mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse d'acide citrique à 5 % (10 mL), H₂O (10 mL), une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (10 mL) et avec H₂O (10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 6/4). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (80 mg, **62 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,03 (3H, t, *J* = 7,1 Hz, H⁹), 1,12 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, H^{9'}), 2,57 (1H, dd, *J* = 7,1 et 16,3 Hz, H^{6a}), 2,71 (1H, dd, *J* = 5,2 et 16,3 Hz, H^{6b}), 3,07 (1H, dd, *J* = 5,4 et 16,3 Hz, H^{3a}), 3,25 (6H, m, H⁸, H^{8'}, H^{3b} et H²), 3,62 (3H, s, OCH₃), 3,81 (3H, s, OCH₃).

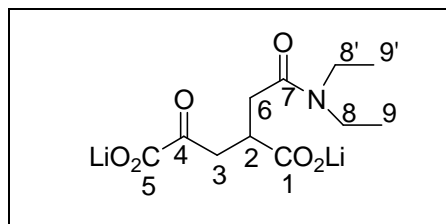
RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 13,0 et 14,1 (C⁹ et C^{9'}), 28,4 (C⁶), 36,6 (C²), 40,30 et 40,34 (C³ et C⁸), 41,8 (C⁸), 52,2 (OCH₃), 53,0 (OCH₃), 160,8 (C⁵), 169,0 (C⁷), 174,2 (C¹), 192,1 (C⁴).

IR (film, cm⁻¹) : 2958 (C-H v), 1736 et 1636 (C=O v), 1439 (C-H δ), 1262 et 1228 (C-O et C-N v).

SM (ES+) *m/z* calc pour C₁₃H₂₁NO₆Na : = 310,1267, exp : 310,1272.

Analyse élémentaire : calculé pour $C_{13}H_{21}NO_6$ (%) : C : 54,35, H : 7,37, N : 4,88
trouvé (%) C : 53,89, H : 7,44, N : 4,59.

2-(2-(diéthylamino)-2-oxoethyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5l ($C_{11}H_{15}NO_6Li_2$, 271,12 g/mol)



Le diester **4l** (62 mg, 0,225 mmol) est dissous dans MeOH (1,2 mL). Une solution aqueuse de LiOH 0,4 M (1,2 mL, 0,47 mmol) fraîchement préparée est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Le pH du milieu est ajusté à 7,6 par ajout de résine acide (Dowex 50WX8 H^+). Après filtration et évaporation des solvants, le produit obtenu est isolé sous la forme d'un solide blanc (58 mg, **quantitatif**).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 0,93 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, H^9), 1,02 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, $H^{9'}$), 2,31 (1H, dd, $J = 7,1$ et 15,3 Hz, H^{6a}), 2,56 (1H, dd, $J = 7,1$ et 15,3 Hz, H^{6b}), 2,75 (1H, dd, $J = 4,9$ et 16,7 Hz, H^{3a}), 2,87 (2H, m, H^{3b} et H^2), 3,19 (2H, m, H^8 et $H^{8'}$).

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 13,4 et 14,4 (C^9 et $C^{9'}$), 31,5 (C^6), 36,1 (C^3), 41,09 (C^2), 42,0 (C^8), 44,1 ($C^{8'}$), 170,8, 174,2 et 183,1 (C^1 , C^5 et C^7), 205,6 (C^4).

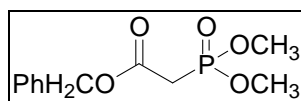
IR (KBr, cm^{-1}) : 3426 (O-H v), 2954 (C-H v), 1708 et 1620 (C=O v), 1427 (C-H δ), 1111 (C-O et C-N v).

SM (ES-) m/z calc pour $C_{11}H_{15}NO_6Li$ 264,1059, exp : 264,1060

calc pour $C_{11}H_{16}NO_6$: 258,0998, exp : 258,0997.

1.11 Synthèse de l'acide 2-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5g

Diméthylphosphonoacétate de benzyle 13

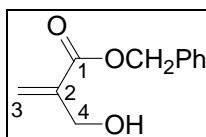


Le 2-bromoacétate de benzyle (10,0 g, 43,6 mmol) est dissous dans le triméthylphosphite (9 mL, 74 mmol). Le mélange est chauffé à 80 °C pendant 24 heures. Le phosphite en excès est ensuite distillé à pression atmosphérique (bp = 150 °C sous 1 mm Hg). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (10,7 g, **95 %**).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3,03 (2H, d, $J = 21,5$ Hz, CH_2), 3,77 (6H, d, $J = 11,2$ Hz, OCH_3), 5,19 (2H, s, OCH_2Ph), 7,35 (5H, m, Har).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 33,3 (d, $J = 134,0$ Hz, CH_2), 53,1 (d, $J = 7,0$ Hz, OCH_3), 128,3, 128,4, 128,5 (CHar), 135,2 (Car), 165,4 (d, $J = 6,0$ Hz, C=O).

2-(hydroxyméthyl)-prop-2-énoate de benzyle 15 ($C_{11}H_{12}O_3$, 192,21 g/mol)



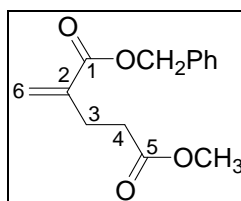
A un mélange du composé **13** (1,0 g, 3,9 mmol) et de formaldéhyde (solution aqueuse à 37 %, 1,45 mL, 19,5 mmol), sous agitation forte, une solution de K_2CO_3 à 1,2 g/mL (7,8 mmol) est ajoutée goutte à goutte. Un précipité blanc apparaît. Le milieu réactionnel est ensuite agité toute une nuit à température ambiante. De l' Et_2O (20 mL) est ajouté et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl (3 x 20 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite après addition d'hydroquinone (1 mg). Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 5/5). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (0,39 g, **52 %**).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,38 (2H, d, $J = 6,5$ Hz, H^4), 5,26 (2H, s, OCH_2Ph), 5,89 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, H^{3a}), 6,34 (1H, s, H^{3b}), 7,37 (5H, m, Har).

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) δ 62,6 (C^4), 66,6 (OCH_2Ph), 126,2 (C^3), 128,1, 128,4, 128,6 (CHar), 135,6 (Car), 139,3 (C^2), 166,1 (C^1).

IR (film, cm^{-1}) : 3420 (O-H v), 3064 et 2942 (C-H v), 1714 (C=O v), 1637 (C=C v), 1455 et 1387 (C-H δ), 1155 et 1054 (C-O et P-O-C v).

2-methylenegutarate de 1-benzyle et de 5-methyle **1g** ($C_{14}H_{16}O_4$, 248,27)



A une solution d'acrylate **15** (5,0 g, 26,0 mmol) dans du toluène anhydre (60 mL), on ajoute l'orthoacétate de triméthyle (6,6 mL) et de l'acide propionique (0,2 mL). Le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 1 h 30. L'azéotrope méthanol-toluène est ensuite distillé (bp = 63°C) afin de déplacer l'équilibre de la réaction. L'ajout d'acide propionique, le chauffage suivi de la distillation sont renouvelés jusqu'à disparition totale du produit de départ constaté en CCM. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie éclair (élution ; AcOEt/cyclohexane : 2/8). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (4,71 g, **73 %**).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2,56 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, H^3), 2,69 (2H, t, $J = 7,4$ Hz, H^4), 3,69 (3H, s, OCH_3), 5,23 (2H, s, OCH_2Ph), 5,65 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H^{6a}), 6,27 (1H, s, H^{6b}), 7,38 (5H, m, Har).

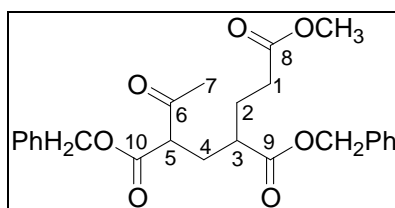
RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) δ 27,3 (C^3), 32,9 (C^4), 51,6 (OCH_3), 66,5 (OCH_2Ph), 126,3 (C^6), 128,1, 128,2, 128,6 (CHar), 135,9 (Car), 138,8 (C^2), 166,4 (C^1), 173,1 (C^5).

IR (film, cm^{-1}) : 3033 et 2952 (C-H v), 1738 et 1714 (C=O esters v), 1632 (C=C v), 1439 (C-H δ), 1169 et 1136 (C-O v), 747 et 698 (C-Har δ)

SM (ES+) calc pour $C_{14}H_{16}O_4Na$: 271,0946, exp : 271,0959.

Analyse élémentaire : calculé pour $C_{14}H_{16}O_4$ (%) C : 67,73, H : 6,50, O : 25,78

trouvé (%) C : 67,65, H : 6,40, O : 25,95.

6-oxoheptane-1,3,5-tricarboxylate de 3,5-dibenzyle et de 1-méthyle 2g (C₂₅H₂₈O₇, 440,49 g/mol)

A une solution du composé **1g** (3,0 g, 12,8 mmol) dans le DMSO (30 mL), on additionne le fluorure de potassium (2,12 g, 36,6 mmol) puis l'acétoacétate de benzyle (2,53 mL, 14,6 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 68 °C pendant 7 h. Après refroidissement à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (5 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (4,0 g, **75 %**).

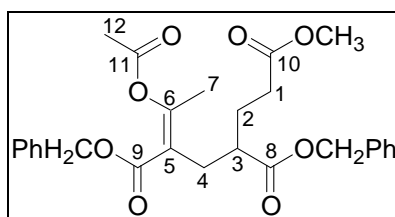
On observe la présence des diastéréoisomères dans un rapport voisin de 1/1.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,73-2,35 (7H, m, H¹⁻⁴), 2,01 (2 x 3H, s, H⁷), 3,41 (1H, dd, *J* = 5,2 et 9,2 Hz, H^{5a}), 3,46 (1H, dd, *J* = 5,9 et 8,6 Hz, H^{5b}), 3,55 (2 x 3H, s, OCH₃), 4,95-5,11 (4 x 2H, m, OCH₂Ph), 7,27 (2 x 5H, m, Har).

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 27,1 et 25,5 (C²), 29,0 (2 x C⁷), 29,4 et 29,8 (C⁴), 31,3 et 31,8 (C¹), 42,3 et 42,5 (C³), 51,6 (OCH₃), 56,6 et 57,4 (C⁵), 66,6 (OCH₂Ph), 67,3 (OCH₂Ph), 127,9, 128,1, 128,2, 128,4, 128,5, 128,6 et 128,6 (CHar), 135,1, 135,2 et 135,7 (Car), 168,8 et 168,9, 173,0, 173,1, 174,2, 174,4, 201,8 et 201,9 (C⁶, C⁸, C⁹ et C¹⁰).

IR (film, cm⁻¹) : 3033 et 2952 (C-H v), 1737 (C=O v), 1644 et 1611 (C=C v), 1453 (C-H δ), 1248, 1213 et 1158 (C-O v), 749 et 699 (C-Har δ).

SM (ES⁺) calc pour C₂₅H₂₈O₇Na : 463,1733, exp : 463,1724.

6-acetoxyhept-5-ene-1, 3, 5-tricarboxylate de 3,5-dibenzyle et de 1-méthyle 3g (C₂₇H₃₀O₈, 482,52 g/mol)

Une solution de produit de Michael **2g** (3,93 g, 8,92 mmol) dans la pyridine distillée (45 mL) est refroidie à 0 °C. On ajoute le chlorure d'acétyle (0,9 mL, 13,35 mmol). Un précipité blanc se forme. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 9 h. L'Et₂O (100 mL) est ajouté puis la phase organique est lavée avec de l'eau (50 mL) et une solution aqueuse saturée en CuSO₄ (2 x 50 mL). La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 7/3). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (3,90 g, **91 %**). On n'observe qu'un seul stéréoisomère par spectroscopie RMN.

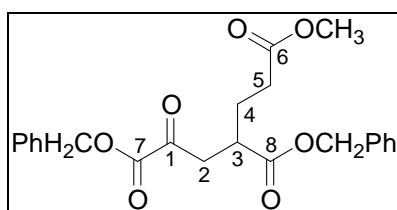
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,75-2,00 (2H, m, H^2), 2,17 (3H, s, H^{12}), 2,25 (2H, m, H^1), 2,28 (3H, s, H^7), 2,45 (1H, dd, $J = 6,1$ et $13,0$ Hz, H^{4a}), 2,62 (1H, m, H^3), 2,69 (1H, dd, $J = 8,2$ et $13,1$ Hz, H^{4b}), 3,64 (3H, s, OCH_3), 5,07 (2H, m, OCH_2Ph), 5,23 (2H, m, OCH_2Ph), 7,35 (2 x 5H, m, Har)

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 19,7 (C^{12}), 20,9 (C^7), 26,9 (C^2), 30,0 (C^4), 31,6 (C^1), 43,9 (C^3), 51,6 (OCH_3), 66,4 et 66,7 (OCH_2Ph), 119,2 (C^5), 128,2, 128,3, 128,5, 128,6 (CHar), 135,6 et 135,9 (Car), 159,0 (C^6), 166,7, 167,9, 173,1 et 174,6 (C^8 , C^9 , C^{10} et C^{11}).

IR (film, cm^{-1}) : 3033 et 2952 (C-H v), 1757 et 1736 (C=O v), 1650 (C=C v), 1450 et 1372 (C-H δ), 1210 et 1166 (C-O v), 749 et 699 (C-Har δ).

SM (ES+) calc pour $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{Na}$: 505,1838, exp : 505,1847.

1,3,5-tricarboxylate-1-oxopentane de 1,3-dibenzyle et 5-méthyle 4g ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$, 412,43 g/mol)



Une solution d'acétate d'énol 3g (3,85 g, 7,98 mmol) dans CH_2Cl_2 anhydre (40 mL) est refroidie à -70°C . On fait buller un mélange d' O_3/O_2 généré par un ozoneur pendant 55 minutes jusqu'à ce qu'une légère coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par un flux d' O_2 pur dans le mélange (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (1 mL, 12,1 mmol) est ensuite ajouté puis le milieu est agité pendant 4 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé avec H_2O (30 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 8/2 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (1,95 g, **59** %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,85–2,02 (2H, m, H^4), 2,34 (2H, m, H^5), 2,92-3,05 (2H, m, H^{2a} et H^3), 3,34 (1H, dd, $J = 8,4$ et $18,1$ Hz, H^{2b}), 3,63 (3H, s, OCH_3), 5,13 (2H, s, OCH_2Ph), 5,28 (2H, s, OCH_2Ph), 7,38 (10H, m, Har).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 26,8 (C^4), 31,3 (C^5), 39,2 (C^3), 40,8 (C^2), 51,7 (OCH_3), 66,9 et 68,1 (OCH_2Ph), 128,2, 128,3, 128,6, 128,70, 128,73 et 128,8 (CHar), 134,3 et 135,5 (Car), 160,1 (C^7), 172,9 et 173,6 (C^6 et C^8), 191,7 (C^1).

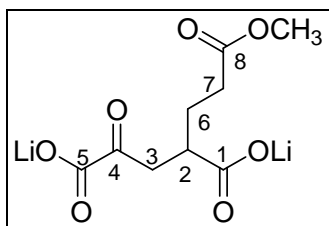
IR (film, cm^{-1}) : 3033 et 2953 (C-H v), 1735 (C=O v), 1454 et 1371 (C-H δ), 1268, 1215 et 1167 (C-O v), 749 et 697 (C-Har δ).

SM (ES+) calc pour $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{Na}$: 435,1420, exp : 435,1423.

Analyse élémentaire : calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$ (%) C : 66,98, H : 5,86

trouvé (%) C : 66,97, H : 6,11.

Acide 2-(3-methoxy-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5g ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_7\text{Li}_2$, 244,05 g/mol)



A une solution de produit **4g** (776 mg, 1,88 mmol) dans le MeOH (20 mL), est additionné du Pd/C à 10 % (143 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 20 min à température ambiante sous une atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur célite et évaporation du solvant, le résidu est repris dans H₂O (30 mL). Le pH de la solution est ajusté à 7,6 par addition d'une solution de LiOH à 0,2 M (18 mL). Après évaporation de H₂O, le produit est isolé sous la forme d'une poudre blanche (450 mg, **quantitatif**).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,72 (2H, m, H⁶), 2,38 (2H, m, H⁷), 2,65 (1H, m, H²), 2,85 (1H, dd, *J* = 5,2 et 18,4 Hz, H^{3a}), 3,05 (1H, dd, *J* = 8,8 et 18,4 Hz, H^{3b}), 3,69 (3H, s, OCH₃)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 27,1 (C⁶), 31,7 (C⁷), 41,9 (C³), 42,3 (C²), 51,4 (OCH₃), 169,6 (C⁵), 176,6 (C⁸), 182,5 (C¹), 204,7 (C⁴)

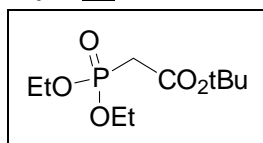
IR (KBr, cm⁻¹) : 3426 (OH v), 2953 (C-H alkyles v), 1718, 1636 et 1588 (C=O ester et acide v), 1420 et 1366 (C-H δ), 1257, 1215 et 1174 (C-O ester v)

SM (ES-) *m/z* calc pour C₉H₁₁O₇ : 231,0505 , exp : 231,0514

I.12 Synthèse du 6-oxoheptane-1,3,5-tricarboxylate de 3,5-ditertbutyl et de 1-méthyle

2h

Diéthylphosphonoacetate de tert-Butyle 14 (C₁₀H₂₁O₅P, 252,24 g/mol)

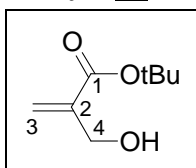


A une solution d'acide diéthylphosphonoacétique (0,16 mL, 1 mmol) dans CH₂Cl₂ anhydre (1 mL), est ajouté le tBuOH fraîchement distillé (0,12 mL, 1,25 mmol) et une solution de DCC (0,23 g, 1,1 mmol) dans CH₂Cl₂ (1mL). Le milieu est agité à Ta pendant 15 min, filtré et évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 2/8 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,24 g, **96 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,31 (6H, t, *J* = 7,0 Hz, 2 x OCH₂CH₃), 1,40 (9H, s, tBu), 2,81 (2H, d, *J* = 21,4 Hz, PCH₂), 4,09 (4H, q, *J* = 7,1 Hz, 2 x OCH₂).

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 16,3 (d, *J* = 3,5 Hz, 2 x OCH₂CH₃), 27,9 (CH₃ du tBu), 35,5 (d, *J* = 66,5 Hz, PCH₂), 62,5 (d, *J* = 3,0 Hz, 2 x OCH₂), 82,0 (C du tBu), 164,8 (C=O).

2-(hydroxyméthyl)-prop-2-énoate de benzyle 16 (C₈H₁₄O₃, 158,19 g/mol)

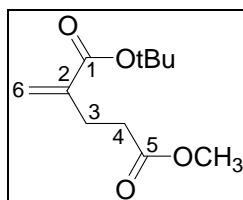


A un mélange du composé **14** (19,3g, 76,5 mmol) et de formaldéhyde (solution aqueuse à 37 %, 23 mL, 306,0 mmol), sous agitation forte, une solution de K_2CO_3 à 1,2 g/mL (84,1 mmol) est ajoutée goutte à goutte. Un précipité blanc apparaît. Le milieu réactionnel est ensuite agité 24 h à Ta. De l' Et_2O (100 mL) est ajouté et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl (3 x 70 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite après addition d'hydroquinone (10 mg). Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 6/4). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (9,2 g, **76 %**).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,48 (9H, s, tBu), 2,80 (1H, s élargi, OH), 4,26 (2H, s, H^4), 5,74 (1H, s, H^{3a}), 6,13 (1H, s, H^{3b}).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 28,0 (CH_3 du tBu), 62,4 (C^4), 81,3 (C du tBu), 124,6 (C^3), 140,8 (C^2), 165,7 (C^1).

2-methyleneglutamate de 1-tert-butyl et de 5-méthyle **1h** ($C_{11}H_{18}O_4$, 214,26)



A une solution d'acrylate **16** (0,29 g, 1,87 mmol) dans du toluène anhydre (3 mL), on ajoute l'orthoacétate de triméthyle (0,5 mL, 3,74 mmol) et de l'acide propionique (0,02 mL, 0,187 mmol). Le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 1 h 30. L'azéotrope méthanol-toluène est ensuite distillé (bp = 63°C) afin de déplacer l'équilibre de la réaction. L'ajout d'acide propionique, le chauffage suivi de la distillation sont renouvelés jusqu'à disparition totale du produit de départ constaté en CCM. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie éclair (élution ; AcOEt/cyclohexane : 2/8). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (0,31 g, **77 %**).

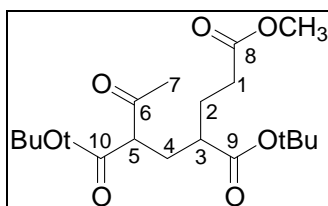
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,48 (9H, s, tBu), 2,52 (2H, t, $J = 7,0$ Hz, H^3), 2,69 (2H, t, $J = 7,2$ Hz, H^4), 3,67 (3H, s, OCH_3), 5,50 (1H, d, $J = 1,3$ Hz, H^{6a}), 6,09 (1H, s, H^{6b}).

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) δ 26,5 (C^3), 27,1 (CH_3 du tBu), 32,2 (C^4), 50,8 (OCH_3), 80,0 (C du tBu), 124,3 (C^6), 139,4 (C^2), 165,2 (C^1), 172,4 (C^5).

IR (film, cm^{-1}) : 2979 (C-H v), 1741 et 1712 (C=O v), 1633 (C=C v), 1440 (C-H δ), 1145 (C-O v).

SM (ES+) calc pour $C_{11}H_{18}O_4Na$: 237,1103, exp : 237,1111.

6-oxoheptane-1,3,5-tricarboxylate de 3,5-tert-butyle et de 1-méthyle **2h** ($C_{19}H_{32}O_7$, 372,45 g/mol)



A une solution du composé **1h** (0,31 g, 1,45 mmol) dans le DMSO (5 mL), on additionne le fluorure de potassium (0,25 g, 4,35 mmol) puis l'acétoacétate de tert-butyl (0,28 mL, 1,7 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 80 °C pendant 24 h. Après refroidissement à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (5 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/AcOEt : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,093 g, **17 %**).

On observe la présence des diastéréoisomères dans un rapport voisin de 1/1.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,33-1,45 (18H, m, tBu), 1,78-2,28 (7H, m, H¹⁻⁴), 2,15-2,18 (2 x 3H, m, H⁷), 3,41 (1H, dd, *J* = 5,1 et 9,7 Hz, H^{5a}), 3,46 (1H, dd, *J* = 5,7 et 8,6 Hz, H^{5b}), 3,59 (2 x 3H, s, OCH₃).

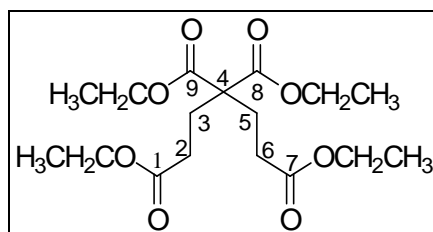
RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 27,0-27,2 (C²), 27,8-28,0 (4 x tBu), 29,9 (C⁴), 31,4 et 31,5 (C¹), 43,1 et 43,2 (C³), 51,5 (OCH₃), 57,8 et 58,7 (C⁵), 80,9 (2 x C de tBu), 82,1 (2 x C de tBu), 168,2, 168,3, 173,1, 173,8, 202,5 et 202,7 (C⁶, C⁸, C⁹ et C¹⁰).

IR (film, cm⁻¹) : 2978 et 2926 (C-H v), 1731-1721 (C=O v), 1446 (C-H δ), 1254 et 1155 (C-O v).

SM (ES+) calc pour C₁₉H₃₂O₇Na : 395,2046 exp : 395,2045.

*1.13 Synthèse de l'acide 2-(3-amino-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium **5m** et de analogues **5n-r***

1,3,3,5-(tetracarboxylate) pentane de tétraéthyle **17 (C₁₇H₂₈O₈, 360,4 g/mol)**

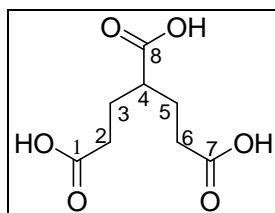


A une solution de malonate d'éthyle (10 mL, 65,9 mmol) dans EtOH (10 mL), on ajoute du Na (110 mg, 4,6 mmol). Après refroidissement du milieu à 0 °C, l'acrylate d'éthyle (21,4 mL, 197,6 mmol) est additionner goutte à goutte. Le milieu est agité à température ambiante toute une nuit. Si la disparition du malonate n'est pas totale le lendemain, quelques mg de Na sont ajoutés et le milieu est chauffé à 80 °C pendant 1 heure. Après refroidissement du milieu à température ambiante, une solution aqueuse d'HCl 1N (5 mL) est ajoutés jusqu'à obtenir un pH = 4 puis on additionne une solution aqueuse saturée en NaCl (15 mL). La phase aqueuse est extraite à l'AcOEt (2 x 35 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. L'excès d'acrylate est éliminé à la rampe sous vide toute une nuit. Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (22,96g, **97 %**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,24 (6H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₃), 1,25 (6H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₃), 2,25 (4H, m, H⁵ et H³), 2,33 (4H, m, H⁶ et H²), 4,15 (4H, q, *J* = 7,2 Hz, OCH₂), 4,24 (4H, q, *J* = 7,2 Hz, OCH₂),

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 14,0 et 14,2 (CH_3), 28,1 (C^5 et C^3), 29,5 (C^6 et C^2), 60,6 et 61,5 (OCH_2), 130,5 (C^4), 170,7 (C^7 et C^1), 172,6 (C^8 et C^9)

acide 1, 3, 5-tricarboxylate pentane 18 ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_6$, 204,18 g/mol)



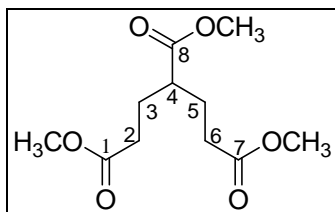
Une solution du composé **17** (5 g, 13,9 mmol) en suspension dans une solution aqueuse en HCl 6N (300 mL) est chauffé à 140 °C pendant 48 heures. Les solvants sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Le résidu solide est repris dans H_2O (100 mL). La phase aqueuse est extraite au cyclohexane (3 x 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (2,7 g, **95 %**)

mp = 114 – 115 °C

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,74 (4H, m, H^5 et H^3), 2,32 (4H, m, H^6 et H^2), 2,36 (1H, m, H^4)

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 26,3 (C^5 et C^3), 31,3 (C^2 et C^6), 43,6 (C^4), 177,5 (C^1 et C^7), 179,4 (C^8)

1,3,5-tricarboxylate-pentane de triméthyle 19a ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_6$, 246,26 g/mol)

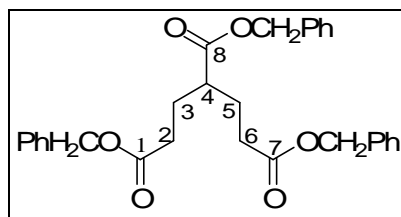


Une solution du composé **18** (2,7 g, 13,23 mmol) dans EtOH (20 mL) avec 2,5 mL de l'acide sulfurique concentré (2,5 mL) est chauffé à 80 °C pendant 48 heures. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite et repris dans H_2O (50 mL). La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (4 x 40 mL). Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution aqueuse saturée en Na_2CO_3 (100 mL) et avec H_2O (100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , et concentrée sous pression réduite. Le produit est isolé pur sous la forme d'un liquide incolore. (2,8g, **86%**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,78 (2H, m, H^{3a} et H^{5a}), 1,85 (2H, m, H^{3b} et H^{5b}), 2,27 (4H, m, H^2 et H^6), 2,39 (1H, m, H^4), 3,60 (6H, s, OCH_3), 3,62 (3H, s, OCH_3),

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 26,9 (C^3 et C^5), 31,6 (C^2 et C^6), 43,8 (C^4), 51,6 et 51,7 (OCH_3), 173,2 (C^1 et C^7), 175,2 (C^8)

1,3,5-tricarboxylate-pentane de triméthyle 19b ($\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_6$, 474,54 g/mol)



A une solution de composé **18** (2 g, 9,8 mmol) dans DMF (10 mL), on additionne le K_2CO_3 (4 g, 29,4 mmol) et le BnBr (3,5 mL, 29,4 mmol). Le milieu est chauffé à 80 °C pendant une nuit. Le milieu est filtré. On ajoute H_2O (10 mL) et la phase aqueuse est extraite à Et_2O (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 8/2 : cyclohexane/ $AcOEt$). Le produit est isolé sous la forme d'huile incolore (2,6 g, **56 %**).

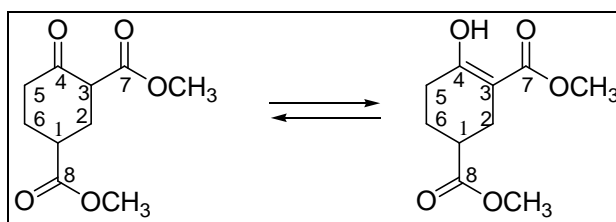
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,90 (2H, m, H^{3a} et H^{5a}), 1,97 (2H, m, H^{3b} et H^{5b}), 2,38 (4H, m, H^2 et H^6), 2,53 (1H, m, H^4), 5,12 (4H, s, 2 x OCH_2), 5,15 (2H, s, OCH_2), 7,56 (15 H, m, Har)

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) δ 27 (C^3 et C^5), 31,7 (C^2 et C^6), 43,8 (C^4), 66,33 (2 x OCH_2), 66,43 (OCH_2), 128,22, 128,25 et 128,6 (CHar), 135,9 (Car), 172,6 (C^1 et C^7), 174,6 (C^8)

IR (film, cm^{-1}) : 3064 et 3033 (C-H ar v), 2951 (C-H alk v), 1736 (C=O ester v), 1454 et 1337 (C-H δ), 1253 et 1160 (C-O ester v), 747 et 698 (C-Har δ)

SM (ES+) m/z calc pour $C_{29}H_{30}O_6Na$: 497,1872, exp : 497,1872

4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate de dibenzyle **20a** ($C_{10}H_{14}O_5$, 214,22 g/mol)

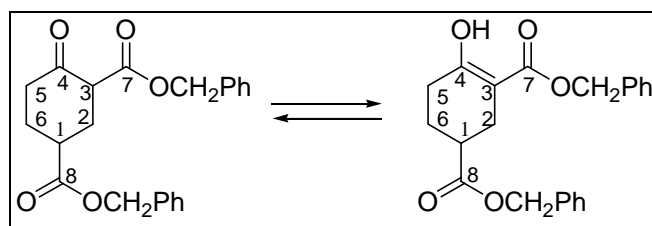


Le sodium coupé en morceaux (0,46 g, 20 mmol) est ajouté à une solution du composé **19a** (4,28g, 17,4 mmol) dans du benzène anhydre (24 mL). Du MeOH fraîchement distillée (0,5 mL) est additionné au milieu réactionnel. Le milieu est ensuite chauffé à 80 °C pendant 24 heures. Le milieu est neutralisé par ajout de quelques gouttes d'acide acétique concentré, puis on additionne H_2O (40 mL). La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/acétate d'éthyle : 7/3). Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (2,8 g, **75 %**).

Le produit en solution se présente sous sa forme énol.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,78 (1H, m, H^{5a}), 2,10 (1H, m, H^{5b}), 2,39 (3H, m, H^6 et H^{2a}), 2,58 (2H, m, H^{2b} et H^1), 3,72 (3H, s, OCH_3), 3,78 (3H, s, OCH_3)

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) δ 24,1 (C^5), 24,8 (C^6), 28,1 (C^2), 39,0 (C^1), 51,5 et 51,8 (OCH_3), 96,1 (C^3), 171,1 (C^4), 172,5 (C^7), 175,0 (C^8)

1,3-dicarboxylate-4-oxocyclohexane de dibenzyle 20b (C₂₂H₂₂O₅, 366,41 g/mol)

Le sodium coupé en morceaux (0,1 g, 4,27 mmol) est ajouté à une solution du composé **19b** (1,9 g, 4,27 mmol) dans du benzène anhydre (40 mL). Du BnOH (0,05 mL) est additionné au milieu réactionnel. Le milieu est ensuite chauffé à 80 °C pendant une nuit. Le milieu est neutralisé par ajout de quelques gouttes d'acide acétique concentré, puis on additionne H₂O (40 mL). La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/acétate d'éthyle : 8/2). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,8 g, **51 %**).

Le produit en solution se présente sous sa forme énol.

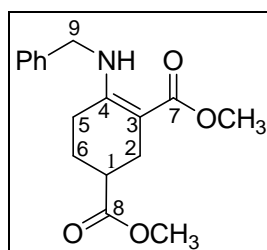
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,73 (1H, m, H^{5a}), 1,97 (1H, m, H^{5b}), 2,27 (2H, m, H⁶), 2,40 (1H, m, H^{2a}), 2,50 (1H, m, H¹), 2,55 (1H, m, H^{2b}), 5,07 (4H, m, 2 x OCH₂), 7,26 (12H, m, Har)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 24,2 (C⁵), 24,8 (C⁶), 28,1 (C²), 39,2 (C¹), 65,9 et 66,4 (OCH₂), 96,2 (C³), 127,9, 128,0, 128,2, 128,5, 128,6 (CHar), 135,9 et 136,0 (Car), 171,6 (C⁴), 171,9 (C⁷), 174,4 (C⁸)

IR (film, cm⁻¹) : 3379 (O-H v), 3033 (C-H ar v), 2945 (C-H alk v), 1731 (C=O ester v), 1652 (C=C v), 1452 et 1311 (C-H δ), 1269 et 1159 (C-O ester v)

SM (ES+) m/z calc pour C₂₂H₂₂O₅Na : 389,1365, exp : 389,1371

Analyses élémentaires : calculées pour C₂₂H₂₂O₅Na (%) C : 73,40, H : 6,37
trouvées (%) C : 73,46, H : 6,42

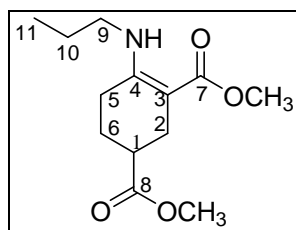
1,3-dicarboxylate-4-(benzylamino)cyclohex-3-ene de diméthyle 21p (C₁₇H₂₁NO₄, 303,35 g/mol)

Sous argon et dans un ballon contenant un fond de tamis moléculaire (4 Å), la benzylamine (2,2 mL, 20,07 mmol) est ajoutée à une solution de cyclohexanone **20a** (3 g, 13,8 mmol) dans le toluène anhydre (12 mL). Le milieu est agité à température ambiante pendant 48 h. Le milieu est filtré et concentré sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (4,1 g, **quantitatif**). Sachant que les énamines sont très sensibles à l'hydrolyse, le brut est directement ozonolysé sans purification ultérieure.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,61 (1H, m, H^{5a}), 1,95 (1H, m, H^{5b}), 2,20 (2H, m, H^{6a} et H^{2a}), 2,31 (2H, m, H^{6b} et H^1), 2,63 (1H, dd, $J = 4,0$ et $14,5$ Hz, H^{2b}), 3,61 (6H, s, OCH_3), 4,33 (2H, s, H^9), 7,48 (5H, m, Har), 9,36 (1H, s élargi, NH)

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 24,3 (C^5), 25,5 (C^6), 26,4 (C^2), 39,0 (C^1), 46,2 (C^9), 50,5 et 51,7 (OCH_3), 88,7 (C^3), 126,7, 127,2, 128,8 (CHar), 139,1 (Car), 158,4 (C^4), 170,7 (C^7), 175,0 (C^8)

1,3-dicarboxylate-4-(propylamino)cyclohex-3-ene de diméthyle 21o ($\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_4$, 255,31 g/mol)

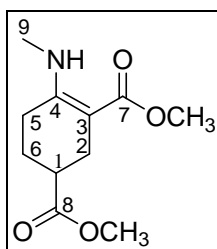


Le produit a été synthétisé suivant le même protocole que pour le composé 21p. Après traitement de la réaction entre le composé 20a (0,5 g, 2,3 mmol) et la propylamine (0,19 mL, 3,45 mmol), on isole le produit sous la forme d'une huile incolore (0,55 g, **quantitatif**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,91 (3H, t, $J = 7,4$ et $15,2$ Hz, H^{11}), 1,51 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, H^{10}), 1,66 (1H, m, H^{5a}), 2,05 (1H, m, H^{5b}), 2,26 (2H, m, H^{6a} et H^{2a}), 2,44 (2H, m, H^{6b} et H^1), 2,60 (1H, dd, $J = 4,9$ Hz, H^{2b}), 3,05 (2H, m, H^9), 3,59 et 3,62 (3H, s, OCH_3), 8,76 (1H, s élargi, NH)

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 11,5 (C^{11}), 23,5 (C^{10}), 24,3 (C^5), 25,6 (C^6), 26,4 (C^2), 39,3 (C^1), 44,1 (C^9), 50,3 et 51,7 (OCH_3), 87,1 (C^3), 158,7 (C^4), 170,7 (C^7), 175,7 (C^8)

1,3-dicarboxylate-4-(méthylamino)cyclohex-3-ene de diméthyle 21n ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_3$, 227,26 g/mol)

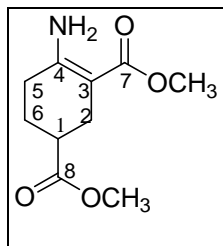


Le produit a été synthétisé suivant le même protocole que pour le composé 21p. Après traitement de la réaction entre le composé 20a (0,5 g, 2,7 mmol) et une solution de méthylamine dans THF 2M (2 mL, 4,15 mmol), on isole le produit sous la forme d'un solide blanc (0,61 g, **quantitatif**)

Mp = 68-70 °C

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,64 (1H, m, H^{5a}), 1,98 (1H, m, H^{5b}), 2,22 (2H, m, H^{6a} et H^{2a}), 2,38 (2H, m, H^{6b} et H^1), 2,60 (1H, dd, $J = 4,4$ et $14,8$ Hz, H^{2b}), 2,78 (3H, d, $J = 5,2$ Hz, H^9), 3,57 et 3,61 (3H, s, OCH_3), 8,76 (1H, s élargi, NH)

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 24,2 (C^5), 25,2 (C^6), 26,4 (C^2), 28,9 (C^9), 39,2 (C^1), 50,1 et 51,6 (OCH_3), 87,4 (C^3), 159,1 (C^4), 170,4 (C^7), 175,6 (C^8)

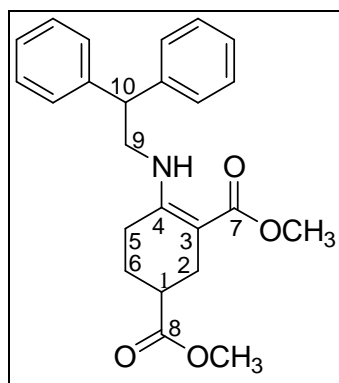
1,3-dicarboxylate-4-aminocyclohex-3-ene de diméthyle 21m (C₁₀H₁₅NO₄, 213,23 g/mol)

Le composé **20a** (1 g, 4,6 mmol) est dissous dans MeOH (5mL). Une solution aqueuse de NH₄OH 20 % (2 mL, 6,9 mmol) est ajoutée et le milieu est agité à Ta pendant 48 h. La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (0,98 g, **quantitatif**).

Mp = 44 - 49 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,71 (1H, m, H^{5a}), 1,97 (1H, m, H^{5b}), 2,22 (2H, m, H^{6a}), 2,30 (2H, m, H^{6b} et H^{2a}), 2,48 (1H, m, H¹), 2,62 (1H, dd, *J* = 5,5 et 15,5 Hz, H^{3b}), 3,65 et 3,67 (3H, s, OCH₃)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 24,2 (C⁵), 25,9 (C²), 29,4 (C⁶), 39,4 (C¹), 50,4 et 51,6 (OCH₃), 89,9 (C³), 155,9 (C⁴), 170,2 (C⁷), 175,7 (C⁸)

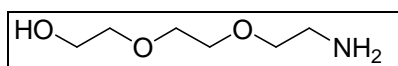
1,3-dicarboxylate-4-(diphényléthylamino)cyclohex-3-ene de diméthyle 21q (C₂₄H₂₇NO₄, 394,48 g/mol)

Le produit a été synthétisé suivant le même protocole que pour le composé **21p**. Après traitement de la réaction entre le composé **20a** (0,1 g, 0,46 mmol) et la diphényléthylamine (91 mg, 0,46 mmol), on isole le produit sous la forme d'un solide blanc (0,18 g, **quantitatif**)

Mp = 145 – 150 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,56 (1H, m, H^{5a}), 1,90 (1H, m, H^{5b}), 2,10 (2H, m, H^{6a}), 2,22 (1H, dd, *J* = 14,5 et 3,5 Hz, H^{2a}), 2,28 (1H, m, H¹), 2,30 (1H, m, H^{6b}), 2,55 (1H, dd, *J* = 4 et 15 Hz, H^{2b}), 3,50 et 3,60 (3H, s, OCH₃), 3,71 (2H, dd, *J* = 13,5 et 7 Hz, H⁹), 4,06 (1H, t, *J* = 7 Hz, H¹⁰), 7,15 (6H, m, Har), 7,23 (4H, m, Har), 8,83 (1H, t, *J* = 5 Hz, NH)

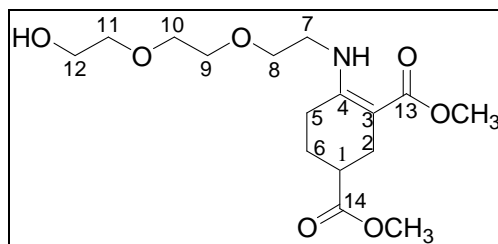
RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 24,3 (C⁵), 25,7 (C⁶), 26,5 (C²), 39,2 (C¹), 50,4 et 51,7 (OCH₃), 52,0 (C⁹), 88,2 (C³), 126,8, 128,0, 128,8 et 129,1 (CHar), 141,9 et 142,0 (Car), 157,7 (C⁴), 170,4 (C⁷), 175,7 (C⁸)

2-[2-(aminoéthoxy)-2-éthoxy]éthanol 22 (C₆H₁₅NO₃, 149,19 g/mol)

A une solution de produit benzylé (200 mg, 1,14 mmol) dissout EtOH (10 mL), est additionné du Pd/C à 10 % (40 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min à température ambiante sous une atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur célite et évaporation du solvant, le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (0,167 g, **98 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,33 (3H, s élargi, OH et NH₂), 2,90 (2H, m, CH₂NH₂), 3,58 (2H, m, OCH₂), 3,65 (6H, m, OCH₂), 3,74 (2H, m, OCH₂)

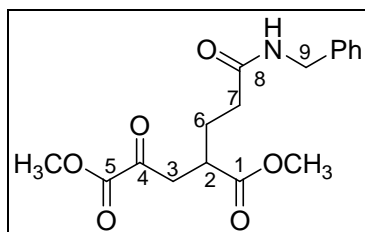
RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 41,5 (CH₂NH₂), 61,6 (CH₂OH), 70,1, 70,4, 72,6, 72,8 (OCH₂)

1,3-dicarboxylate-4-(2-(2-(2-hydroxyéthoxy)éthoxy)éthylamino)cyclohex-3-ène de diméthyle 21r (C₁₆H₂₇NO₇, 345,39 g/mol)

Le produit a été synthétisé suivant le même protocole que pour le composé **21p**. Après traitement de la réaction entre le composé **20a** (1 g, 4,61 mmol) et l'amine **22** (0,99 g, 4,61 mmol), on isole le produit sous la forme d'un solide blanc (1,6 g, **quantitatif**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,73 (1H, m, H^{5a}), 2,04 (1H, m, H^{5b}), 2,35 (2H, m, H^{6a} et H^{2a}), 2,49 (2H, m, H^{6b} et H¹), 2,66 (1H, dd, *J* = 5 et 15 Hz; H^{2b}), 3,30 (2H, m, H⁷), 3,56 (4H, m, 2x CH₂O), 3,59 (3H, s, OCH₃), 3,61 (4H, m, 2 x OCH₂), 3,62 (OCH₃), 3,67 (2H, t, *J* = 5,0 Hz, H¹²), 9,02 (1H, s élargi, NH)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 24,3 (C⁵), 25,7 (C⁶), 26,4 (C²), 39,33 (C¹), 42,1 (C⁷), 50,6 et 51,7 (OCH₃), 61,8 (C¹²), 70,1, 70,3 et 70,7 (3 x OCH₂), 72,9 (C⁸), 88,1 (C³), 158,3 (C⁴), 170,8 (C¹³), 175,7 (C¹⁴)

2-(3-(benzylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 4p (C₁₇H₂₁NO₆, 335,35 g/mol)

Une solution du composé **21p** (4,18 g, 13,8 mmol) dans CH₂Cl₂ anhydre (100 mL) est refroidie à - 70 °C. On fait buller un mélange d'O₃/O₂ généré par un ozoneur pendant 70

minutes jusqu'à ce qu'une légère coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par un flux d'O₂ pur dans le mélange (disparition de la coloration bleu). Le milieu est agité toute une nuit à température ambiante. Le triphénylphosphine (3,2 g, 12,42 mmol) est ensuite ajouté puis le milieu est agité pendant 24 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé avec H₂O (20 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (20 mL). Après évaporation des solvants, le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; cyclohexane/acétate d'éthyle : 3/7). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (1,98 mg, **43 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,94 (2H, m, H⁶), 2,24 (2H, m, H⁷), 2,92 (2H, dd et m superposés, *J* = 4,4 et 19,7 Hz, H^{3a} et H²), 3,28 (1H, dd, *J* = 10,2 et 19,7 Hz, H^{3b}), 3,64 et 3,85 (3H, s, OCH₃), 4,39 (2H, d, *J* = 5,7 Hz, H⁹), 6,18 (1H, s élargi, NH), 7,27 (5H, m, Har)

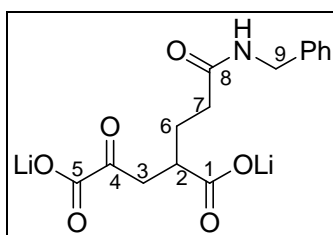
RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 27,25 (C⁶), 33,56 (C⁷), 39,2 (C²), 40,8 (C³), 43,6 (C⁹), 52,1 et 52,9 (OCH₃), 126,8, 127,5 et 128,7 (CHar), 138,2 (Car), 160,7 (C⁵), 171,5 (C⁸), 174,4 (C⁹), 191,9 (C⁴)

IR (film, cm⁻¹) : 3338 et 3303 (N-H v), 3064 et 3025 (C-H aromatiques v), 2944 (C-H alkyles v), 1733 (C=O ester v), 1654 (C=O amide v), 1541 (N-H δ), 1437 et 1387 (C-H δ), 1263 et 1171 (C-O ester v), 740 et 701 (C-Har δ)

SM (ES+) *m/z* calc pour C₁₇H₂₁NO₆Na : 358,1267, exp : 358,1267

Analyses élémentaires : calculées pour C₁₇H₂₁NO₆ : (%) C : 60,89, H : 6,31, N : 4,18
trouvées (%) C : 61,07, H : 6,60, N : 4,22

2-(3-(benzylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5p (C₁₅H₁₅NO₆Li₂, 319,16 g/mol)



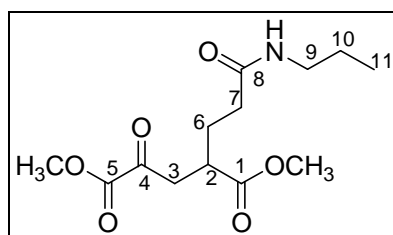
Le diester (157 mg, 0,47 mmol) est dissous dans MeOH (2,5 mL). Une solution aqueuse de LiOH 0,4M (2,5 mL, 1 mmol) fraîchement préparée est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Le pH du milieu est ajusté à pH 7,6 par ajout de résine acide (DOWEX 50WX8). Après filtration et évaporation des solvants, le produit obtenu est isolé sous la forme d'un solide beige (149 mg, **quantitatif**).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,78 (2H, m, H⁶), 2,29 (2H, m, H⁷), 2,63 (1H, m, H²), 2,83 (1H, dd, *J* = 6,0 et 17,6 Hz, H^{3a}), 3,02 (1H, dd, *J* = 8,0 et 17,6 Hz, H^{3b}), 4,36 (2H, s, H⁹), 7,35 (5H, m, Har)

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ 28,2 (C⁶), 33,7 (C⁷), 41,6 (C³), 42,2 (C²), 42,9 (C⁹), 127,2, 127,4 et 128,7 (CHar), 137,9 (Car), 170,0 (C⁵), 175,8 (C⁸), 182,3 (C¹), 204,3 (C⁴)

IR (KBr, cm⁻¹) : 3414 (O-H et N-H v), 3067 (C-H ar v), 2932 (C-H alk v), 1714 (C=O ester v), 1636 (C=O amide v), 1579 (N-H δ), 1420 et 1356 (C-H δ), 1257 et 1112 (C-O v), 744 et 700 (C-Har δ)

SM (ES-) *m/z* calc pour C₁₅H₁₆NO₆ : 306,0978, exp : 306,0991

2-(3-(propylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 4o (C₁₃H₂₁NO₆, 287,31 g/mol)

Le composé **21o** (1,08 g, 4,61 mmol) a été ozonolysé suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **4p**. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair (éluant ; 3/7 : cyclohexane/acétate d'éthyle puis acétate d'éthyle pur). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,46 g, **35 %**).

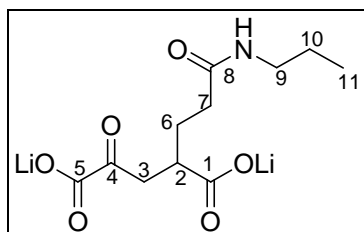
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,85 (3H, t, *J* = 7,4 Hz, H¹¹), 1,45 (2H, st, *J* = 7,2 Hz, H¹⁰), 1,89 (2H, m, H⁶), 2,15 (2H, m, H⁷), 2,88 (1H, m, H²), 2,90 (1H, dd, *J* = 4,6 et 19,8 Hz, H^{3a}), 3,13 (2H, dd, *J* = 7,0 et 13,5 Hz, H⁹), 3,25 (1H, dd, *J* = 10,1 et 19,7 Hz, H^{3b}), 3,81 et 3,63 (3H, s, OCH₃), 5,64 (1H, s élargi, NH)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 11,4 (C¹¹), 22,8 (C¹⁰), 27,3 (C⁶), 33,7 (C⁷), 39,3 (C²), 40,9 (C³), 41,2 (C⁹), 52,1 et 53,1 (OCH₃), 160,9 (C⁵), 171,6 (C⁸), 174,6 (C¹), 192,0 (C⁴)

IR (film, cm⁻¹) : 3389 et 3306 (N-H v), 2959 et 2875 (C-H alk v), 1732 (C=O ester v), 1648 (C=O amide v), 1545 (N-H δ), 1442 et 1381 (C-H δ), 1264 et 1166 (C-O ester v)

SM (ES+) *m/z* calc pour C₁₃H₂₁NO₆Na : 310,1267, exp : 310,1274

Analyses élémentaires : calculées pour C₁₃H₂₁O₆N, ½ H₂O (%) C : 52,69, H : 7,48, N : 4,73
trouvées : C : 52,92, H : 7,48, N : 4,67

2-(3-(propylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5o (C₁₁H₁₅NO₆Li₂, 271,12 g/mol)

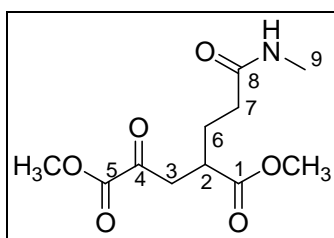
Le composé **4o** (1 g, 3,48 mmol) a été saponifié suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **5p**. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,94 g, **quantitatif**)

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 0,86 (3H, t, *J* = 7,4 Hz, H¹¹), 1,50 (2H, st, *J* = 7 Hz, H¹⁰), 1,75 (2H, m, H⁶), 2,23 (2H, m, H⁷), 2,62 (1H, m, H²), 2,84 (1H, dd, *J* = 5,2 et 18,4 Hz, H^{3a}), 3,04 (1H, dd, *J* = 8,4 et 18,4 Hz, H^{3b}), 3,12 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, H⁹)

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ 10,6 (C¹¹), 21,7 (C¹⁰), 27,9 (C⁶), 33,7 (C⁷), 41,2 (C³ et C⁹), 41,5 (C²), 170,8 (C⁵), 175,7 (C⁸), 181,6 (C¹), 204,2 (C⁴)

IR (KBr, cm⁻¹) : 3482 et 3420 (O-H et N-H v), 2974, 2932 et 2875 (C-H alk v), 1714 (C=O ester v), 1636 et 1620 (C=O amide v), 1574 (N-H δ), 1418 et 1361 (C-H δ), 1262 (C-O v)

SM (ES-) *m/z* calc pour C₁₁H₁₆NO₆ : 258,0978, exp : 258,0995

2-(3-(methylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 4n (C₁₁H₁₇O₆N, 259,26 g/mol)

Le composé **21n** (1,35 g, 5,95 mmol) a été ozonolysé suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **4p**. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair (éluant ; 3/7 : cyclohexane/acétate d'éthyle puis acétate d'éthyle pur). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,54 g, **35 %**).

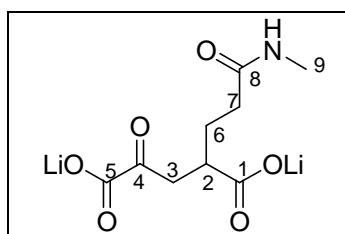
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,88 (2H, m, H⁶), 2,17 (2H, m, H⁷), 2,72 (2H, d, *J* = 4,8 Hz, H⁹), 2,86 (1H, m, H²), 2,90 (1H, dd, *J* = 4,3 et 20,0 Hz, H^{3a}), 3,24 (1H, dd, *J* = 10,1 et 20,0 Hz, H^{3b}), 3,80 et 3,61 (3H, s, OCH₃), 6,03 (1H, s élargi, NH)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 26,3 (C⁹), 27,3 (C⁶), 33,4 (C⁷), 39,2 (C²), 40,9 (C³), 52,0 et 53,1 (OCH₃), 160,7 (C⁵), 172,3 (C⁸), 174,4 (C¹), 192,0 (C⁴)

IR (film, cm⁻¹) : 3394 et 3313 (N-H v), 2947 (C-H alk v), 1735 (C=O ester v), 1652 (C=O amide v), 1554 (N-H δ), 1436 et 1384 (C-H δ), 1264 et 1170 (C-O ester v)

SM (ES+) *m/z* calc pour C₁₁H₁₇NO₆Na : 282,0954, exp: 282,0968

Analyses élémentaires : calculées pour C₁₁H₁₇O₆N (%) C : 50,96, H : 6,61, N : 5,40
trouvées (%) C : 50,73, H : 6,65, N : 5,41

2-(3-(methylamino)-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de dilithium 5n (C₉H₁₁NO₆Li₂, 243,07 g/mol)

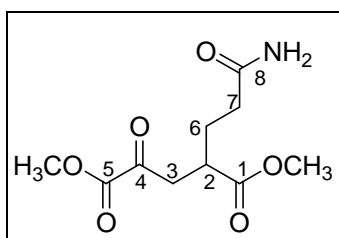
Le composé **4n** (1 g, 3,86 mmol) a été saponifié suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **5p**. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,935 g, **quantitatif**).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,58 (2H, m, H⁶), 2,08 (2H, m, H⁷), 2,47 (1H, m, H²), 2,56 (3H, s, H⁹), 2,71 (1H, dd, *J* = 5,2 et 18,4 Hz, H^{3a}), 2,89 (1H, dd, *J* = 8,4 et 18,4 Hz, H^{3b})

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ 25,8 (C⁹), 28,4 (C⁶), 33,7 (C⁷), 41,0 (C³), 42,6 (C²), 169,8 (C⁵), 176,6 (C⁸), 182,6 (C¹), 204,4 (C⁴)

IR (KBr, cm⁻¹) : 3426 (O-H et N-H v), 2936 (C-H alk v), 1708 (C=O ester v), 1636 (C=O amide v), 1577 (N-H δ), 1416 et 1355 (C-H δ), 1163 et 1113 (C-O v)

SM (ES-) *m/z* calc pour C₉H₁₂NO₆ : 236,0746, exp : 236,0789

2-(3-amino-3-oxopropyl)-4-oxoglutarate de diméthyle 4m (C₁₀H₁₅O₆N, 245,23 g/mol)

Le composé **21m** (0,895 g, 4,2 mmol) a été ozonolysé suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **4p**. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair (éluant ; 3/7 : cyclohexane/acétate d'éthyle puis 9/1 : acétate d'éthyle/MeOH). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,43 g, **41** %).

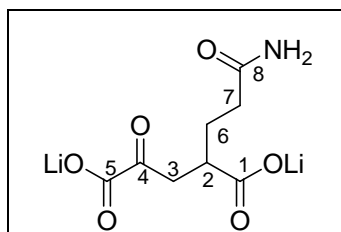
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,97 (2H, m, H⁶), 2,29 (2H, m, H⁷), 2,96 (1H, m, H²), 2,97 (1H, dd, *J* = 5 et 20 Hz, H^{3a}), 3,30 (1H, dd, *J* = 10 et 20 Hz, H^{3b}), 3,67 et 3,86 (3H, s, OCH₃), 5,72 (1H, s élargi, NH)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 26,9 (C⁶), 32,8 (C⁷), 39,2 (C²), 40,9 (C³), 52,1 et 53,1 (OCH₃), 160,8 (C⁵), 174,2 et 174,3 (C¹ et C⁸), 191,9 (C⁴)

IR (film, cm⁻¹) : 3453 et 3363 (N-H v), 3010 et 2957 (C-H alk v), 1730 (C=O ester v), 1667 (C=O amide v), 1440 et 1396 (C-H δ), 1269 et 1173 (C-O ester v)

SM (ES+) *m/z* calc pour C₁₀H₁₅NO₆Na : 268,0797, exp : 268,0798

Analyses élémentaires : calculées pour C₁₀H₁₅O₆N (%) C : 48,98, H : 6,17, N : 5,71
trouvées (%) C : 49,12, H : 6,22, N : 5,54

2-(3-(amino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de dilithium 5m (C₈H₉NO₆Li₂, 229,04 g/mol)

Le composé **4m** (1 g, 4,07 mmol) a été saponifié suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **5p**. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,935 g, **quantitatif**)

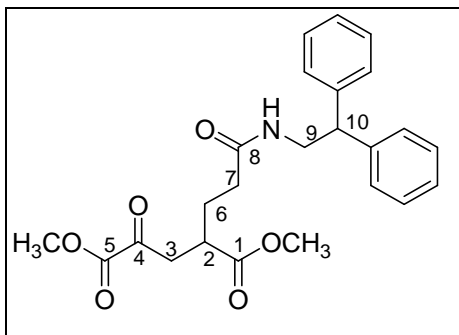
RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ 1,73 (2H, m, H⁶), 2,22 (2H, m, H⁷), 2,61 (1H, m, H²), 3,82 (1H, dd, *J* = 5 et 20 Hz, H^{3a}), 3,02 (1H, dd, *J* = 10 et 20 Hz, H^{3b})

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ 28,2 (C⁶), 33,0 (C⁷), 42,0 (C³), 42,8 (C²), 169,7 (C⁵), 179,2 (C⁸), 182,6 (C¹), 204,3 (C⁴)

IR (KBr, cm⁻¹) : 3428 - 3223 (O-H et N-H v), 2959 (C-H alk v), 1708 (C=O ester v), 1665 (C=O amide v), 1574 (N-H δ), 1416 et 1354 (C-H δ), 1111 (C-O v)

SM (ES+) *m/z* calc pour C₈H₁₀NO₆ : 216,0508, exp: 216,0509

2-(3-(diphenylethylamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle 4q
 (C₂₄H₂₇NO₆, 425,47 g/mol)



Le composé **21q** (1,8 g, 4,6 mmol) a été ozonolysé suivant le protocole décrit précédemment pour le composé **4p**. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 5/5 cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,43 g, **25 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,85 (2H, m, H⁶), 2,13 (2H, m, H⁷), 2,85 (1H, m, H²), 2,88 (1H, dd, *J* = 4,5 et 18,5 Hz, H^{3a}), 3,26 (1H, m, H^{3b}), 3,62 et 3,89 (3H, s, OCH₃), 3,92 (2H, dd, *J* = 6 et 8 Hz, H⁹), 4,20 (1H, t, *J* = 8 Hz, H¹⁰), 5,65 (1H, s élargi, NH), 7,24 (10H, m, Har)

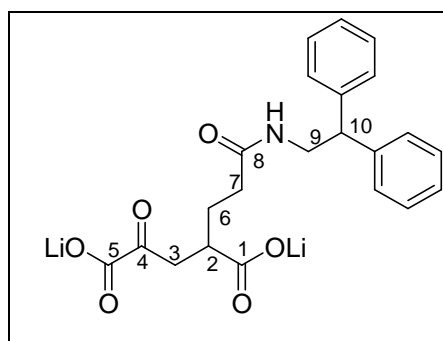
RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 27,2 (C⁶), 29,7 (C⁷), 39,0 (C²), 40,9 (C³), 43,8 (C⁹), 50,6 (C¹⁰), 52,0 et 53,1 (OCH₃), 126,8, 128,0, 128,8 et 129,1 (CHar), 141,8 (2 x Car), 160,8 (C⁵), 171,6 (C⁸), 174,3 (C¹), 191,8 (C⁴)

IR (film, cm⁻¹) : 3400 (N-H v), 3044 et 3023 (C-H aromatiques v), 2956 (C-H alkyles v), 1735 (C=O ester v), 1668 (C=O amide v), 1533 - 1518 (N-H et C-Har δ), 1446 (C-H alk δ), 1247 et 1192 (C-O ester v), 1073 (C-Har δ)

SM (ES+) *m/z* calc pour C₂₄H₂₈NO₆ : 426,1917, exp : 426,1933

Analyses élémentaires : calculées pour C₂₄H₂₇NO₆, ¼ H₂O : (%) C : 67,04, H : 6,45, N : 3,25
 trouvées (%) C : 66,98, H : 6,49, N : 3,11

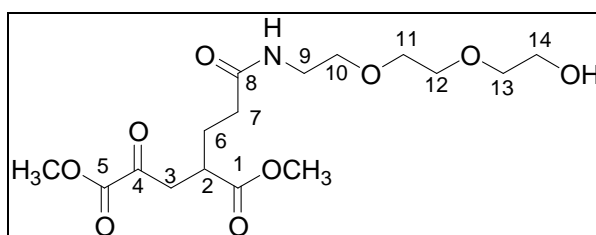
2-(3-(diphenylethylamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de dilithium 5q
 (C₂₂H₂₁NO₆Li₂, 409,29 g/mol)



Le composé **4q** (0,13 g, 0,3 mmol) a été saponifié suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **4p**. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,110 g, **90 %**)

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,49 (2H, m, H^6), 2,09 (2H, t, $J = 8 \text{ Hz}$, H^7), 2,44 (1H, dd, $J = 2$ et $18,0 \text{ Hz}$, H^{3a}), 2,70 (1H, dd, $J = 5,5$ et $18,0 \text{ Hz}$, H^{3b}), 2,90 (1H, m, H^2), 3,84 (2H, dd, $J = 8$ et $1,3 \text{ Hz}$, H^9), 4,20 (1H, t, $J = 8,2 \text{ Hz}$, H^{10}), 5,65 (1H, s élargi, NH), 7,24 (10H, m, Har)
 RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 28,6 (C^6), 34,4 (C^7), 41,1 (C^2), 41,8 (C^3), 44,3 (C^9), 50,9 (C^{10}), 127,9, 128,8 et 129,8 (Char), 142,9 (Car), 171,9 (C^5), 176,3 (C^8), 182,2 (C^1), 205,9 (C^4)
 IR (KBr, cm^{-1}) : 3410 (O-H et N-H v), 3072, 3030 et 2959 (C-Har et alk v), 1716 (C=O ester v), 1649 (C=O amide v), 1495, 1446 et 1420 (C-H δ), 1265 et 1228 (C-O v)
 SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_6$: 396,1447, exp: 396,1451

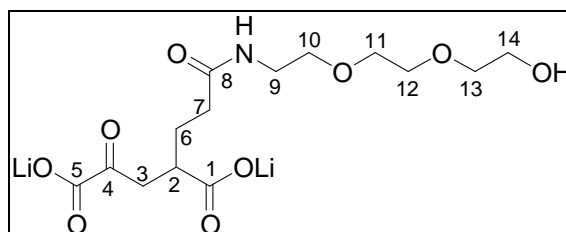
2-(3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethylamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle 4r ($\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_9$, 377,39 g/mol)



Le composé **21r** (1,6 g, 4,6 mmol) a été ozonolysé suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **4p**. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair (éluant ; 9/1 : CH_2Cl_2 /acétone). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,6 g, **35 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,88 (2H, m, H^6), 2,17 (2H, m, H^7), 3,15 (1H, m, H^2), 3,16 (1H, dd, $J = 4,5$ et $19,7 \text{ Hz}$, H^{3a}), 3,52 (1H, dd, $J = 10,1$ et $19,7 \text{ Hz}$, H^{3b}), 3,67 (2H, m, H^{10}), 3,76 (2H, m, H^{11}), 3,66 à 3,95 (6H, m, 3 x OCH_2), 3,88 (3H, s, OCH_3), 3,94 (2H, m, H^{14}), 3,88 (3H, s, OCH_3), 6,48 (1H, s élargi, NH)
 RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 27,3 (C^6), 33,5 (C^7), 39,2 (C^2), 39,25 (C^3), 40,8 (C^9), 52,1 et 53,1 (OCH_3), 61,6 (C^{14}), 70,15, 70,25 et 70,7 (C^{11} , C^{12} et C^{13}), 72,4 (C^{10}), 160,8 (C^5), 172,0 (C^8), 174,5 (C^1), 191,9 (C^4)
 IR (film, cm^{-1}) : 3333 (N-H v), 2951 et 2875 (C-H alkyles v), 1735 (C=O ester v), 1652 (C=O amide v), 1545 (N-H δ), 1440 et 1380 (C-H δ), 1262, 1108 et 1107 (C-O ester v)
 SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_9\text{Na}$: 378,1764, exp : 378,1755
 Analyses élémentaires : calculées pour $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_9$ (%) C : 50,92, H : 7,21, N : 3,71
 trouvées (%) C : 50,75, H : 7,27, N : 3,69

2-(3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethylamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle 5r ($\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_9\text{Li}_2$, 361,20)



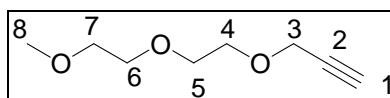
Le composé **4r** (0,455 g, 1,2 mmol) a été saponifié suivant le protocole précédemment décrit pour le composé **5p**. Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,410 g, **95 %**)

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,68 (2H, m, H^6), 2,17 (2H, m, H^7), 2,54 (1H, m, H^2), 2,76 (1H, dd, $J = 5,6$ et $18,4$ Hz, H^{3a}), 2,95 (1H, dd, $J = 8,5$ et $18,4$ Hz, H^{3b}), 3,29 (2H, m, H^9), 3,54 (4H, m, H^{10} et H^{13}), 3,59 (4H, m, H^{11} et H^{12}), 3,63 (2H, m, H^{14})
 RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 30,9 (C^6), 36,3 (C^7), 41,4 (C^9), 44,4 (C^3), 45,1 (C^2), 62,8 (C^{14}), 71,3 (C^{10}), 72,0 (C^{11} et C^{12}), 74,2 (C^{13}), 172,3 (C^5), 178,8 (C^8), 185,2 (C^1), 206,9 (C^4)
 IR (film, cm^{-1}) : 3423 (O-H et N-H v), 2939 et 2876 (C-H alkyles v), 1708 (C=O ester v), 1636 (C=O amide v), 1577 (N-H δ), 1418 et 1355 (C-H δ), 1096 e 1058 (C-O v)
 SM (ES-) m/z calc pour $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_9\text{Li}_2$: 348,1281, exp : 348,1291

1.14 Synthèse de l'acide 2-((2-(2-(2-(4-((2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)methyl)-1H-

*1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-4-oxoglutamate de dilutium **5t***

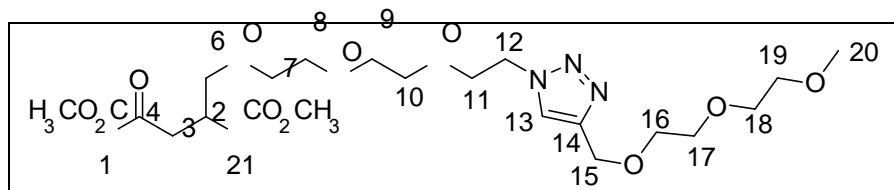
3-(2-(2-methoxyéthoxy)éthoxy)prop-1-yne **35** ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3$, 158,19 g/mol)



A une suspension de NaH (0,48 g, 10 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) refroidie à 0°C , on ajoute goutte à goutte une solution de 2-(2-methoxyethoxy)ethanol (1,19 mL, 10 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). Le milieu est agité 30 min à température ambiante, puis on additionne lentement une solution de bromure de propargyle (1,25 mL, 10 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). Un précipité beige apparaît. Le milieu est agité 5 h à température ambiante jusqu'à ce que le milieu devienne neutre. H_2O (20 mL) est ajouté et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 97/3 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (1,2 g, **76 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,44 (1H, $J = 2,4$ Hz, H^1), 3,39 (3H, s, OCH_3), 3,58 (2H, m, OCH_2), 3,65 à 3,74 (6H, m, 3 x OCH_2), 4,22 (2H, d, $J = 2,4$ Hz, H^3)
 RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 58,4 (C^3), 59,0 (OCH_3), 69,1, 70,4, 70,5 et 71,9 (OCH_2), 74,5 (C^1), 79,6 (C^2)
 IR (film, cm^{-1}) : 3256 (C-H alcyne v), 2877 (C-H alk v), 2200 ($\text{C}\equiv\text{C}$ v), 1458 et (C-H δ), 1135 et 1102 (C-O v)
 SM (ES+) calc pour $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_3\text{Na}$: 181,0841, exp : 181,0839

2-((2-(2-(2-(4-((2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle 4t
($C_{22}H_{37}O_{11}N_3$, 519,54 g/mol)



A une solution du composé **4b** (0,1 g, 0,277 mmol) dans MeOH (1 mL), on ajoute successivement l'alcyne **35** (48 mg, 0,277 mmol), la solution aqueuse de $CuSO_4$ 0,1 M (0,03 mL, 0,028 mmol), H_2O (0,4 mL) et la solution aqueuse d'acide ascorbique 0,3 M (0,03 mL, 0,084 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 1 h. H_2O (10 mL) est ajouté et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (5 x 10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 97/3 : $CH_2Cl_2/MeOH$). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (0,089 g, **62 %**).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3,05 (1H, dd, $J = 18,1$ et $5,2$ Hz, H^{3a}), 3,24 (1H, m, H^2), 3,35 (1H, dd, $J = 8,0$ et $18,1$ Hz, H^{3b}), 3,36 (3H, s, H^{20}), 3,51 à 3,73 (18H, m, 9 x OCH_2), 3,62 (3H, s, OCH_3), 3,84 (3H, s, OCH_3), 3,85 (2H, t, $J = 6,4$ Hz, H^{11}), 3,86 (3H, s, OCH_3), 4,52 (2H, t, $J = 5,8$ Hz, H^{12}), 4,66 (2H, s, H^{15}), 7,73 (1H, s, H^{13})

RMN ^{13}C (100MHz, $CDCl_3$) δ 38,1 (C^3), 41,1 (C^2), 50,2 (C^{12}), 51,8 (OCH_3), 53,0 (OCH_3), 56,0 (C^{20}), 64,6 (C^{15}), 69,4, 69,6 et 70,3 (OCH_2), 70,5 (3 x OCH_2), 70,6 (3 x OCH_2), 71,9 (OCH_2), 123,8 (C^{13}), 144,9 (C^{14}), 160,9 (C^1), 172,5 (C^{21}), 192,4 (C^4)

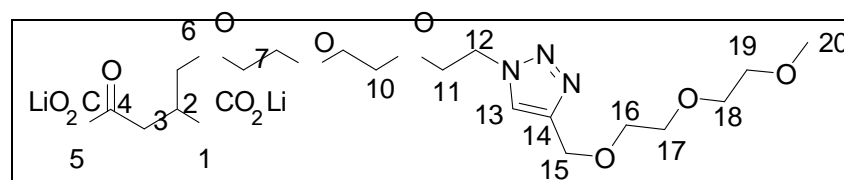
IR (film, cm^{-1}) : 2947 et 2874 (C-H alk v), 1732 (C=O ester v), 1456 et 1439 (C-H δ), 1249, 1224 et 1110 (C-O v)

SM (ES+) calc pour $C_{22}H_{38}O_{11}N_3$: 520,2506, exp : 520,2491

Analyses élémentaires : calculées pour $C_{22}H_{37}O_{11}N_3$ (%) C : 50,86, H : 7,18, N : 8,09

trouvées (%) C : 50,88, H : 7,34, N : 7,79

2-((2-(2-(2-(4-((2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-4-oxopentanedioate de diméthyle 5t
($C_{20}H_{31}O_{11}N_3Li_2$, 503,36 g/mol)



Le diester **4t** (40 mg, 0,077 mmol) est dissous dans MeOH (1 mL). Une solution aqueuse de LiOH 0,4M (0,4 mL, 0,162 mmol) fraîchement préparée est ajoutée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Le pH du milieu est ajusté à pH 7,6 par ajout de résine acide (DOWEX 50WX8). Après filtration et évaporation des solvants, le produit obtenu est isolé sous la forme d'un solide beige (39 mg, **quantitatif**).

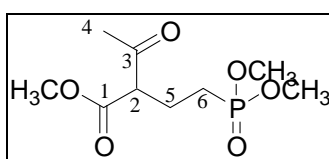
RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 2,80 à 3,00 (3H, m, H^2 et H^3), 3,26 (3H, s, H^{20}), 3,46 à 3,63 (18H, m, 9 x OCH_2), 3,87 (2H, t, $J = 5,0 \text{ Hz}$, H^{11}), 4,54 (2H, t, $J = 5,2 \text{ Hz}$, H^{12}), 4,59 (2H, s, H^{15}), 7,99 (1H, s, H^{13})

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ 39,4 (C^3), 43,4 (C^2), 50,3 (C^{12}), 57,9 (C^{20}), 63,3 (C^{15}), 68,7, 68,9 et 69,4 (OCH_2), 69,5 (2 x OCH_2), 69,55 (2 x OCH_2), 69,6 (OCH_2), 71,0 (OCH_2), 71,9 (OCH_2), 126,3 (C^{13}), 144,4 (C^{14}), 169,7 (C^5), 180,6 (C^1), (C^4 pas visible)

SM (ES+) calc pour $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_{11}\text{N}_3$: 492,2193, exp : 492,2188.

1.15 Synthèse de l'acide 2 céto-4-phosphorylbutanoate de lithium **26**

2-(2-(dimethoxyphosphono)ethyl)-3-oxobutanoate de méthyle **23** ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_6\text{P}$, 252,2 g/mol)



A une solution de vinylphosphonate de diméthyle (2,6 mL, 22,04 mmol) dans MeOH (20 mL), on additionne le fluorure de potassium (4,5 g, 66,12 mmol) puis l'acétoacétate de méthyle (3,6 mL, 33,06 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 68 °C pendant 24 h. Après refroidissement à température ambiante, une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL) est ajoutée au mélange réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (5 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; AcOEt/MeOH : 95/05). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (1,79 g, **32 %**).

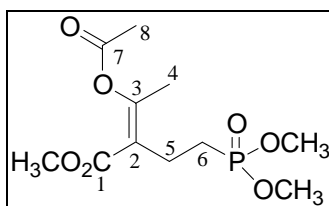
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,76 (2H, m, H^5), 2,11 (2H, m, H^6), 2,25 (3H, s, H^4), 3,62 (1H, t, $J = 7,2 \text{ Hz}$, H^2), 3,74 (3H, s, CO_2CH_3), 3,73 (2 x 3H, d, $J = 10,5 \text{ Hz}$, $\text{P}(\text{OCH}_3)_2$).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 21,0 (C^5 , d, $J = 4,0 \text{ Hz}$), 21,5 et 22,9 (C^6 , d, $J = 11,0 \text{ Hz}$), 29,4 (C^4), 52,5 ($\text{P}(\text{OCH}_3)_2$, d, $J = 6,4 \text{ Hz}$), 52,7 (OCH_3), 58,9 (C^2 , d, $J = 13,9 \text{ Hz}$), 169,6 (C^1), 202,2 (C^3).

IR (film, cm^{-1}) : 2956 et 2853 (C-H v), 1734 et 1717 (C=O v), 1441 et 1361 (C-H δ), 1244 (P=O v), 1030 (P-O et C-O v), 817 (P-C v).

MS (ES+) m/z calc pour $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_6\text{PNa}$: 275,0660, exp : 275,0653.

3-acetoxy-2-(2-(dimethoxyphosphoryl)ethyl)but-2-enoate de méthyle **24** ($\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_7\text{P}$, 294,24 g/mol)



Une solution de produit de Michael **23** (5,0 g, 19,83 mmol) dans la pyridine distillée (80 mL) est refroidie à 0 °C. On ajoute le chlorure d'acétyle (2,1 mL, 29,8 mmol). Un précipité blanc se forme. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. L' Et_2O (100

mL) est ajouté puis la phase organique est lavée avec de l'eau (75 mL) et une solution aqueuse saturée en CuSO_4 (2 x 50 mL). Les phases aqueuses sont extraites avec AcOEt (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; AcOEt/MeOH : 95/05). Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (4,6 g, **79 %**). On n'observe qu'un seul stéréoisomère par spectroscopie RMN.

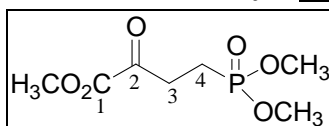
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,83 (2H, m, H^6), 2,20 (3H, s, H^8), 2,27 (3H, s, H^4), 2,46 (2H, m, H^5), 3,71 (2 x 3H, d, $J = 10,5$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_3)_2$), 3,75 (3H, s, CO_2CH_3).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 20,5 (C^8), 20,6 (d, $J = 3,1$ Hz, C^5), 20,9 (C^4), 23,8 (C^6 , d, $J = 137,7$ Hz), 51,9 (OCH_3), 52,3 (d, $J = 6,4$ Hz, $\text{PO}(\text{OCH}_3)_2$), 121,0 (C^2 , d, $J = 17,9$ Hz), 158,5, 167,3, 168,3 (C^1 , C^3 et C^7).

IR (film, cm^{-1}) : 2956 (C-H v), 1761 et 1720 (C=O v), 1654 (C=C v), 1440 et 1374 (C-H δ), 1212 (P=O v), 1147 et 1117 (C-O v), 1058 (P-O-C v), 817 (P-C v).

SM (ES $^+$) calc pour $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_7\text{PNa}$: 317,0766, exp : 317,0753.

4-(dimethoxyphosphoryl)-2-oxobutanoate de méthyle **25** ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{P}$, 224,15 g/mol)



Une solution d'acétate d'énol **24** (4,0 g 13,6 mmol) dans CH_2Cl_2 anhydre (40 mL) est refroidie à -70°C . On fait buller un mélange d' O_3/O_2 généré par un ozoneur pendant 180 minutes jusqu'à ce qu'une légère coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par un flux d' O_2 pur dans le mélange (disparition de la coloration bleu). Le sulfure de diméthyle (1,6 mL, 20,7 mmol) est ensuite ajouté puis le milieu est agité pendant 4 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est lavé avec H_2O (30 mL) et avec une solution aqueuse saturée en NaCl (30 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 et concentrée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; AcOEt/MeOH : 95/5). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (1,8 g, **59 %**).

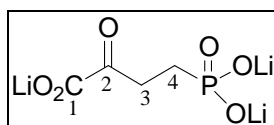
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,08 (2H, td, $J = 7,1$ et $12,4$ Hz, H^4), 3,16 (2H, td, $J = 7,0$ et $10,6$ Hz, H^3), 3,75 (2 x 3H, d, $J = 10,9$ Hz, $\text{P}(\text{OCH}_3)_2$), 3,89 (3H, s, CO_2CH_3).

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 17,4 et 18,89 (C^4 , d, $J = 145,1$ Hz), 32,9 (C^3 , d, $J = 3,15$ Hz), 52,7 ($\text{P}(\text{OCH}_3)_2$, d, $J = 6,3$ Hz), 53,2 (OCH_3), 160,8 (C^1), 191,7 (C^2 , d, $J = 14,8$ Hz).

IR (film, cm^{-1}) : 2958 et 2854 (C-H v), 1736 (C=O v), 1443, 1411 et 1365 (C-H δ), 1245 (P=O v), 1029 (C-O et P-O-C v), 822 (P-C v).

SM (ES $^+$) calc pour $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{PNa}$: 247,0347, exp : 247,0341.

2-oxo-4-phosphonatobutanoate de trilithium **26** ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{PLi}_3$, 199,87 g/mol)



A -5°C , le bromure de triméthylsilane (0,41 mL, 3,18 mmol) est ajouté goutte à goutte sur le composé **25** (200 mg, 0,89 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures. Après évaporation de l'excès de TMSBr et refroidissement du résidu à 0

°C, on additionne H₂O (10 mL). Le milieu est agité à température ambiante toute une nuit. Le pH est ajusté à 7,5 en ajoutant une solution aqueuse de LiOH 1M. Après évaporation de l'eau, on obtient un solide blanc qui est repris dans un minimum de H₂O. Le produit précipite après ajout de 6 volumes EtOH. Le solide est filtré, lavé avec EtOH (20 mL) et avec Et₂O (20 mL). Après séchage, on isole un solide blanc (99 mg, **56 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,51 (2H, td, *J* = 7,9 et 16,2 Hz, H⁴), 2,82 (2H, td, *J* = 7,2 et 15,8 Hz, H³).

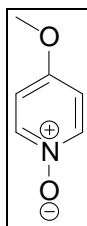
RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 22,5 (d, *J* = 130,6 Hz, C⁴), 35,1 (C³), 170,3 (C¹), 207,0 (d, *J* = 15,8 Hz, C²).

IR (KBr, cm⁻¹) : 3452 (O-H ν), 2958 (C-H ν), 1709 et 1606 (C=O ν), 1406 (C-H δ), 1233 et 1195 (P=O ν), 1101 (C-O et P-O-C ν), 995 (P-C ν).

SM (ES⁺) calc pour C₄H₄O₆PLi₃Na : 180,9902, exp : 180,9918.

I.16 Synthèse de l'acide 2-carboxylique-3-(methoxycarbonyl)-4-oxoazetidine 30 et de son analogue 32

4-methoxypyridine 1-oxide 27 (C₆H₇NO₂, 125,13 g/mol)

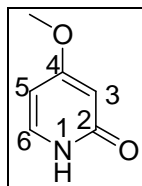


A une solution de 4-nitropyridine (2 g, 14,3 mmol) dans le MeOH anhydre (30 mL), on ajoute le NaOMe (1,24 g, 22,9 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant toute une nuit. Le milieu est ensuite filtré et le solide est lavé abondamment au MeOH. Le filtrat est ensuite concentré sous pression réduite et repris dans un mélange AcOEt/MeOH (1/1). Le précipité est filtré et rincé au MeOH. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le produit est ainsi isolé sous la forme d'un solide jaune (1,8 g, **quantitatif**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,69 (3H, s, OCH₃), 6,65 (2H, d, *J* = 7,0 Hz, 2 x Har), 7,96 (2H, d, *J* = 7,0 Hz, 2 x Har)

RMN ¹³C (100MHz, dmso d⁶) 56,1 (OCH₃), 112,2 (2 x CHar), 139,5 (2 x CHar), 156,5 (Car)

4-methoxypyridin-2(1H)-one 28 (C₆H₇NO₂, 125,13 g/mol)



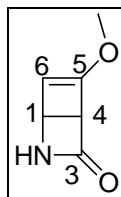
Le composé 27 (1,8 g, 14,3 mmol) est dissous dans l'anhydride acétique (50 mL). Le milieu est chauffé 6 h à 140 °C. L'anhydride acétique est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est repris dans un mélange H₂O/MeOH (1/1, 300 mL). Le milieu est agité à

température ambiante pendant 7 h. Les solvants sont éliminés sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 95/5 : AcOEt/MeOH). Le produit est ensuite recristallisé dans CH₃CN. Il est isolé sous la forme de cristaux beiges (1g, **59 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,82 (3H, s, OCH₃), 5,97 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H³), 6,07 (1H, dd, H⁵), 7,29 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H⁶)

RMN ¹³C (100MHz, dmso d⁶) δ 55,2 (OCH₃), 96,7 (CHar), 99,0 (CHar), 135,2 (C⁵), 164,1 (C⁴), 168,4 (C²)

5-methoxy-2-aza-bicyclo[2.2.0]hex-5-en-3-one 29 (C₆H₇NO₂, 125,13 g/mol)

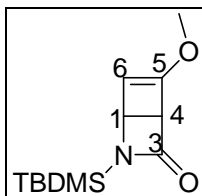


Une solution du composé **28** (0,253 g, 2 mmol) dans le THF distillé (300 mL) est irradiée à l'aide d'une lampe en pyrex pendant 4 h. Le milieu est ensuite concentré sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'un solide beige (0,25 g, **quantitatif**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,67 (3H, s, OCH₃), 4,24 (1H, m, H¹), 4,26 (1H, dd, *J* = 0,8 et 2,8 Hz, H⁴), 5,13 (1H, d, *J* = 1,2 Hz, H⁶), 6,17 (1H, s, NH)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) 43,1 (C¹), 56,8 (OCH₃), 60,4 (C⁴), 102,0 (C⁶), 160,1 (C⁵), 170,9 (C³)

2-(tert-butyldimethylsilyl)-5-methoxy-2-aza-bicyclo[2.2.0]hex-5-en-3-one 31
(C₁₂H₂₁NO₂Si, 239,39 g/mol)



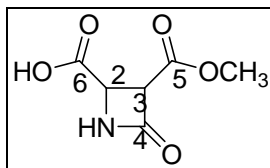
Une solution de diisopropylamine (0,28 mL, 2 mmol) dans 5 mL de THF anhydre est refroidie à – 40 °C. On ajoute goutte à goutte une solution de BuLi dans l'hexane 1,6M (1,25 mL, 2 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite agité à 0°C pendant 30 min.

Après refroidissement du milieu à – 70 °C, on ajoute goutte à goutte une solution du composé **29** (0,25 g, 2 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). Une solution de TBDMSCl dans le THF 1M (2,2 mL, 2,2 mmol) est alors additionné lentement. Le milieu est ensuite agité à température ambiante pendant 3 heures. Une solution aqueuse saturée en NH₄Cl (10 mL) est ajoutée et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (2 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair de petite taille (éluant ; 6/4 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide jaune (0,26 g, **54 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,16 (3H, s, SiCH₃), 0,21 (3H, s, SiCH₃), 0,92 (9H, s, tBuSi), 3,64 (3H, s, OCH₃), 4,11 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H⁴), 4,21 (1H, dd, *J* = 2,5 et 1,2 Hz, H¹), 5,02 (1H, d, *J* = 1,2 Hz, H⁶)

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) – 6,8 et – 6,25 (SiCH_3), 25,9 (tBuSi), 44,0 (C^1), 58,7 (OCH_3), 60,8 (C^4), 102,7 (C^6), 160,4 (C^5), 173,7 (C^3)

Acide 2-carboxylic-3-(methoxycarbonyl)-4-oxoazetidine 30 ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_5$, 173,12 g/mol)



Une solution du composé 29 (0,25 g, 2 mmol) dans l'acétone (12 mL) est refroidie à - 70 °C. On fait buller un mélange d' O_3/O_2 généré par un ozoneur pendant 50 minutes jusqu'à ce qu'une légère coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par un flux d' O_2 pur dans le mélange (disparition de la coloration bleu). Le réactif de Jones (0,96 mL, 2,4 mmol) est ajouté et on laisse le milieu revenir doucement à température ambiante. Le mélange réactionnel est filtré et évaporé sous pression réduite. Une solution aqueuse saturée en NaCl (15 mL) est ajoutée et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (15 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. On obtient le produit sous la forme d'une huile (600 mg). Le reste de la phase aqueuse est extraite en continu avec AcOEt toute une nuit. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le produit sous la forme d'un mélange *cis/trans* (1/1) est isolé sous la forme d'une huile (107 mg, **83 %** en rendement total).

Isomère *Cis*

RMN ^1H (400 MHz, acétone d_6) δ 3,58 (3H, s, OCH_3), 4,33 (2H, AB, H^2 et H^3), 7,75 (1H, s, NH)

RMN ^{13}C (100MHz, acétone d_6) 50,6 (C^3), 52,4 (OCH_3), 59,5 (C^2), 161,8 (C^4), 167,2 et 170,5 (C^5 et C^6)

SM (ES-) calc pour $\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_5$: 172,0246, exp : 172,0253

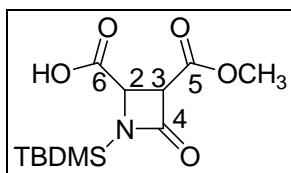
Isomère *trans*

RMN ^1H (400 MHz, acétone d_6) δ 3,65 (3H, s, OCH_3), 4,07 (1H, d, $J = 2,4 \text{ Hz}$, H^3), 4,31 (1H, d, $J = 2,4 \text{ Hz}$, H^2), 7,75 (1H, s, NH)

RMN ^{13}C (100MHz, acétone d_6) 50, 7 (C^2), 52,9 (OCH_3), 60,7 (C^3), 161,9 (C^4), 167,5 et 171,6 (C^5 et C^6)

SM (ES-) calc pour $\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_5$: 172,0246, exp : 172,0244

Acide 2-carboxyl-1-(tert-butyldimethylsilyl)-3-(methoxycarbonyl)-4-oxoazetidine 32
($\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{Si}$, 287,38 g/mol)



Une solution du composé 31 (0,257 g, 1,07 mmol) dans l'acétone (6 mL) est refroidie à - 70 °C. On fait buller un mélange d' O_3/O_2 généré par un ozoneur pendant 15 minutes jusqu'à ce qu'une légère coloration bleu du milieu apparaisse. L'excès d'ozone est alors éliminé par

un flux d'O₂ pur dans le mélange (disparition de la coloration bleu). Le réactif de Jones (0,52 mL, 1,3 mmol) est ajouté et on laisse le milieu revenir doucement à température ambiante. Le mélange réactionnel est filtré et évaporé sous pression réduite. Une solution aqueuse saturée en NaCl (10 mL) est ajoutée et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (6 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 7/3 : CHCl₃/Acetone + 5 % acide acétique). Le produit est isolé sous la forme d'une huile incolore (0,09 g, **29 %**).

Isomère *Cis*

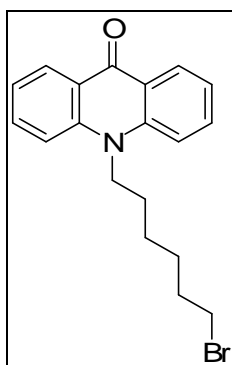
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,16 (3H, s, SiCH₃), 0,29 (3H, s, SiCH₃), 0,95 (9H, s, tBuSi), 3,72 (3H, s, OCH₃), 4,25 (1H, d, *J* = 6,2 Hz, H²), 4,48 (1H, d, *J* = 6,2 Hz, H³)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) – 6,8 et – 6,25 (SiCH₃), 26,2 (tBuSi), 51,8 (C²), 53,0 (OCH₃), 60,4 (C³), 165,6 (C⁴), 165,8 et 174,5 (C⁵ et C⁶).

SM (ES+) calc pour C₁₂H₂₁NO₅SiNa : 310,1087, exp : 310,1082

*I.17 Synthèse du 10-(5-(prop-2-ynyloxy)pentyl)acridin-9(10H)-one **37***

10-(5-bromohexyl)acridin-9(10H)-one **36** (C₁₉H₂₀O₂NBr, 358,27 g/mol)



A une solution d'acridone (0,1 g, 0,51 mmol) dans DMF anhydre (5 mL), on ajoute successivement NaH (22 mg, 0,56 mmol) et le 1, 6-dibromohexane (0,47 mL, 3,06 mmol). Le milieu est ensuite chauffé à 130 °C pendant une nuit. H₂O (10 mL) puis une solution aqueuse HCL 1 % (10 mL) sont additionnés. La phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 30 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 7/3 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (0,12 g, **66 %**).

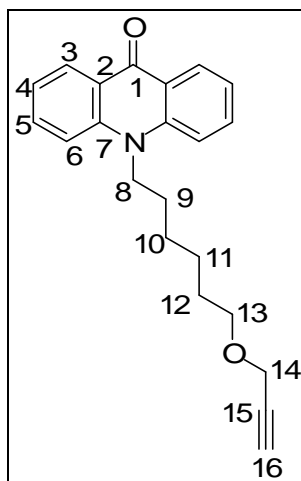
Mp = 95-97 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,60 (4H, m, 2 x CH₂), 1,95 (4H, m, 2 x OCH₂), 3,45 (2H, t, *J* = 6,6 Hz, CH₂Br), 4,36 (2H, 2 d, *J* = 8,3 Hz, NCH₂), 7,30 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, 2 x Har), 7,48 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, 2 x Har), 7,34 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, 2 x Har), 8,60 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, 2 x Har)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) 26,1, 27,0 et 27,8 (CH₂), 32,6 (CH₂CH₂Br), 33,6 (CH₂Br), 46,0 (NCH₂), 114,4, 121,3 (2 x CHar), 122,5 (2 x Car), 128,1 et 133,9 (2 x Char), 141,7 (2 x Car), 177,9 (C=O)

IR (CCl₄, cm⁻¹) : 3075, 2937 et 2859 (C-H alk v), 1643 (C=O v), 1607 (C=Car v), 1490 et 1463 (C-Har δ), 1377 (C-H δ), 1292, 1261 et 1176 (C-O v)

SM (ES+) calc pour C₁₉H₂₁ON : 358,0807, exp : 358,0795

10-(5-(prop-2-ynoxy)pentyl)acridin-9(10H)-one 37 ($C_{22}H_{23}NO_2$, 333,40 g/mol)

A une suspension de NaH (11 mg, 0,28 mmol) dans le THF anhydre (2 mL), on ajoute goutte à goutte l'alcool propargylique (0,017 mL, 0,28 mmol). Le milieu réactionnel est alors agité à température ambiante pendant 30 min. Une solution du composé 36 (95 mg, 0,28 mmol) dans le THF anhydre (3 mL) est ensuite ajouté lentement. Le milieu est chauffé à 70 °C pendant 4 h. Le pH du milieu est ajusté à 7 par ajout d'acide acétique concentré. H₂O (10 mL) est ajouté et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 7/3 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'un solide jaune (64 mg, **68 %**).

Mp = 85-89 °C

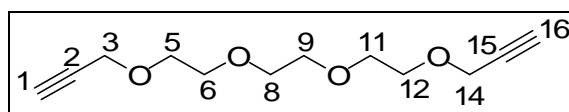
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 1,55 (4H, m, 2 x CH₂), 1,69 (2H, m, OCH₂), 1,97 (2H, m, OCH₂), 2,43 (1H, t, *J* = 2,3 Hz, H¹⁶), 3,56 (2H, 2 d, *J* = 6,3 Hz, H¹³), 4,16 (2H, d, *J* = 2,3 Hz, H¹⁴), 4,36 (2H, t, *J* = 8,3 Hz, H⁸), 7,30 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, 2 x Har), 7,50 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, 2 x Har), 7,74 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, 2 x Har), 8,59 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, 2 x Har)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) 25,9, 26,7 et 27,1 (CH₂), 29,4 (C¹²), 46,1 (C⁸), 58,1 (C¹⁴), 69,9 (C¹³), 114,5, 121,2 (2 x CHar), 122,5 (2 x Car), 128,1 et 133,9 (2 x CHar), 141,8 (2 x Car), 177,9 (C=O)

IR (CCl₄, cm⁻¹) : 3312 (C-H alcyne ν), 2937 et 2859 (C-H alk ν), 2150 (C≡C faible ν), 1642 (C=O n), 1607 (C=Car n), 1489 et 1463 (C-Har d), 1377 (C-H δ), 1292, 1176 et 1104 (C-O ν)

SM (ES⁺) calc pour C₂₂H₂₄NO₂ : 334,1807, exp : 334,1792

Analyses élémentaires : calculées pour C₂₂H₂₃NO₂ (%) C : 79,25, H : 6,95, N : 4,20
trouvées (%) C : 79,15, H : 6,99, N : 3,91

1.18 Synthèse de 4,7,10,13-tetraoxahexadeca-1,15-diyne 38

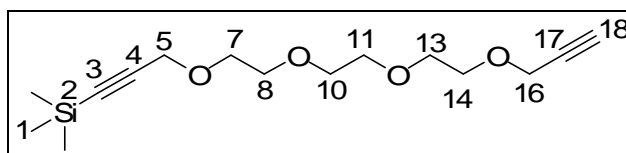
(C₁₂H₁₈O₄, 226,07 g/mol)

Une suspension de NaH (1,14 g, 28,6 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) est refroidie à 0 °C. On ajoute goutte à goutte une solution de bromure de propargyle (3 mL, 28 mmol) dans le THF anhydre (10 mL). Le milieu est agité 30 min à température ambiante. Une solution de triéthylèneglycol (2 g, 13 mmol) dans le THF anhydre (10 mL) est ensuite ajouté lentement. Le milieu est gité pendant 3 h à température ambiante. Le pH du milieu est ajusté à 7 par ajout d'acide acétique concentré. H₂O (30 mL) est ajouté et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 6/4 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (2,07 g, **70 %**).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,42 (2H, t, *J* = 2,4 Hz, H¹ et H¹⁶), 3,68 (12H, m, 6 x OCH₂), 4,19 (4H, d, *J* = 2,4 Hz, H³ et H¹⁴)

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ 58,4 (C³ et C¹⁴), 69,1, 70,4, 70,6 (2 x OCH₂), 74,5 (C¹ et C¹⁶), 79,6 (C² et C¹⁵)

1.19 Synthèse de 2,2-diméthyl-6,9,12,15-tetraoxa-2-silaoctadeca-3,17-diyne **39**



(C₁₅H₂₆O₄Si, 298,45 g/mol)

Méthode A

A une suspension de EtMgBr dans le THF 2,5 M (1 mL, 2,5 mmol) refroidie à 0°C, on ajoute goutte à goutte une solution du composé **38** (0,58 g, 2,5 mmol) dans le THF anhydre (5 mL). La solution est agitée 1 h à 0°C puis une solution de TMSCl (fraîchement distillé sur la tributylamine) dans le THF anhydre (5 mL) est additionnée lentement. Le milieu est agité à température ambiante toute une nuit. Une solution aqueuse saturée en NH₄Cl (10 mL) est ajoutée et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 15 mL). Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 7/3 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (81 mg, **12 %**).

Méthode B

Une solution du composé **38** (0,1 g, 0,43 mmol) dans le THF anhydre (2 mL) est refroidie à – 70 °C. La phénanthroline (1 mg) puis une solution de BuLi 1,6 M dans l'hexane (0,42 mL) est ajouté jusqu'à obtenir une coloration brune du milieu réactionnel. On rajoute du BuLi (0,21 mL, 0,344 mmol) et on laisse le milieu sous agitation à – 70 °C pendant 40 min. Le TMSCl (0,055 mL, 0,43 mmol) est ensuite ajouté goutte à goutte. Une solution aqueuse saturée en NH₄Cl (5 mL) est ajoutée et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 10 mL). Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 7/3 : cyclohexane/AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (10 mg, **9 %**).

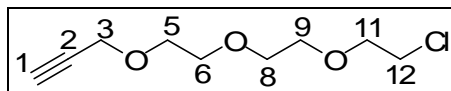
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 0,09 (9H, s, SiMe_3), 2,37 (1H, t, $J = 2,4 \text{ Hz}$, H^{18}), 3,58 (12H, m, 6 x OCH_2), 4,11 (2H, d, $J = 2,4 \text{ Hz}$, H^{16}), 4,12 (2H, s, H^5)

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 0,0 (TMS), 58,5 (C^{16}), 59, 3 (C^5), 69,18, 69,23 (OCH_2), 70,6 (2 x OCH_2), 70,7, 71,15 (OCH_2), 74,7 (C^{18}), 79,8 (C^{17}), 91,5 (C^4), 101,7 (C^3)

IR (film, cm^{-1}): 3338 (C-H alcyne ν), 2959-2900 (C-H alk ν), 2179 ($\text{C}\equiv\text{C}$ ν), 1455, 1349 et 1300 (C-H δ), 1251, 1135 et 1102 (C-O ν), 845 (C-H δ)

SM (ES+) calc pour $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{SiNa}$: 321,1498, exp : 321,1499

1.20 Synthèse du 3-(2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-yne **40**



($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3\text{Cl}$, 206,67 g/mol)

A une suspension de NaH (0,236 g, 5,9 mmol) dans le THF anhydre (5 mL), on additionne lentement une solution de 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethanol (0,86 mL, 5,9 mmol). Le milieu est ensuite agité à température ambiante pendant 30 min, puis une solution de bromure de propargyle (0,63 mL, 5,9 mmol) dans le THF anhydre (5 mL) est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16h. Le pH du milieu est ajusté à 7 par ajout d'acide acétique concentré. H_2O (10 mL) est ajouté et la phase aqueuse est extraite avec AcOEt (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie éclair (éluant ; 7/3 : cyclohexane/ AcOEt). Le produit est isolé sous la forme d'un liquide incolore (0,2 g, **16 %**).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,42 (1H, t, $J = 2,4 \text{ Hz}$, H^1), 3,63 (2H, t, $J = 6,0 \text{ Hz}$, H^{12}), 3,66 à 3,71 (8H, m, 4 x OCH_2), 3,76 (2H, t, $J = 6,0 \text{ Hz}$, H^{11}), 4,20 (2H, d, $J = 2,4 \text{ Hz}$, H^3)

RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) δ 42,7 (C^{12}), 58,4 (C^3), 69,1, 70,5, 70,6, 70,7, 71,4 (OCH_2), 74,5 (C^1), 79,6 (C^2)

IR (film, cm^{-1}) : 3292 (C-H alcyne ν), 2871 (C-H alk ν), 2179 ($\text{C}\equiv\text{C}$ ν), 1458, 1351 et 1300 (C-H δ), 1134 et 1104 (C-O ν)

SM (ES+) calc pour $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3\text{ClNa}$: 229,0607, exp : 229,0600

Chapitre II Synthèse des analogues de l'acide Glutamique 33

II.1 Généralités

Toutes les solutions sont préparées en utilisant un tampon phosphate 0,1M avec un pH de 7,6. Les enzymes disponibles sous la forme de suspension dans le sulfate d'ammonium 3M, sont centrifugées 3min à une vitesse de 10 500 tours par minutes. Les culots obtenus sont solubilisés dans le tampon phosphate de potassium à 0,1 M. Toutes les mesures cinétiques sont réalisées dans des cuvettes à usage unique en polystyrène avec un trajet optique de 1 cm avec un spectrophotomètre du type HITACHI U-2010.

Les enzymes AspAT et BCAT d'*E.Coli* sont produites et purifiées au laboratoire. La GluDH, (Glutamate DésHydrogénase du foie de bœuf), la LDH (Lactic DésHydrogénase du muscle de lapin) et la MDH (Malic DésHydrogénase de cœur de bœuf) sont commercialisées chez Sigma.

II.2 Protocole général de transamination avec l'AspAT d'*E.coli*

Le cétooglutarate (1 éq) et l'ACS (1 éq) sont dissous dans H₂O de telle sorte à avoir une concentration de 20 mM en KG. Le pH du milieu réactionnel est ajusté à 7,6 avec une solution aqueuse en KOH 1 M. L'AAT est centrifugée (3 min, 10 500 t/min). Le culot est ensuite dissous dans 1 mL de milieu réactionnel et la solution est additionnée au reste du milieu réactionnel. Au cours de la réaction, le KG et l'acide pyruvique produit sont dosés à intervalle de temps réguliers.

Lorsque le taux de conversion en KG est de 45 %, le milieu réactionnel est déposé sur une colonne de résine fortement acide (Dowex^(R) 50WX8, 200-400 mesh, H⁺). La résine est lavée abondamment à l'eau afin d'éliminer le KG résiduel, l'excès d'ACS et l'acide pyruvique. Une seconde élution avec une solution aqueuse en NH₄OH 1M permet de décrocher le produit de la résine. Les fractions contenant le produit souhaité sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris dans un minimum d'eau et déposé sur une résine fortement basique (DOWEX^(R) 2X8-400). La colonne est élue à l'eau puis avec un gradient d'AcOH (0,1 à 2M), d'acide formique (0,5 à 2M), de TFA (1 à 2M) et d'HCl 3M. Les fractions contenant le produit désiré sont rassemblées, évaporées sous pression réduite. Le résidu est ensuite lyophilisé. L'acide aminé est isolé sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement global d'environ 45 %.

II.3 Protocole de dosage du KG pour le suivi de la transamination

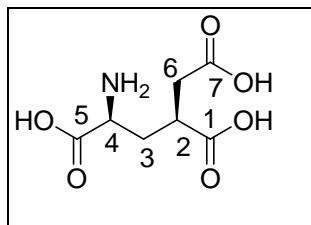
Dans une cuvette, sont introduits 20 µl d'une solution de NADH (10mg/mL), 10 µl d'une solution de MDH (200 UI/mL, 2UI), 10 µl d'une solution d'AspAT (242 UI/mL, diluée 3 x) et 955 µl de tampon phosphate contenant 40 mM d'acide aspartique. Après avoir mesuré la DO initiale en s'assurant qu'elle est bien stable sur une durée de une minute (notée DO_i pour $\lambda = 340$ nm), 5 µl de milieu réactionnel est ajouté dans la cuvette du spectrophotomètre. Après environ 300 secondes, la DO finale (notée DO_f) devenue constante est mesurée. La concentration en KG restant dans le milieu est donnée par la formule suivante : $\frac{(DO_f - DO_i)}{6220} \times 100$

II.4 Protocole de dosage du pyruvate pour le suivi de la transamination

Dans une cuvette, sont introduits 20 µl d'une solution de NADH (10mg/mL), 20 µl d'une solution de LDH (200 UI/mL, 2UI) et 955 µl de tampon phosphate. Après avoir mesuré

la DO initiale (notée DOi pour $\lambda = 340$ nm), 5 μ l de milieu réactionnel est ajouté dans la cuvette du spectrophotomètre. Après environ 300 secondes, la DO finale (notée DOf) devenue constante est mesurée. La concentration en pyruvate en M produit lors de la transamination est alors donnée par la formule suivante : $(DO_f - DO_i) / 6220 * 100$

II.5 Acide (2S,4S) 1,2,4-tricarboxylic-4-aminobutane **33d**



($C_7H_{11}NO_6$, 205,17 g/mol)

Lorsque le taux de conversion de la transamination du composé **5e** atteint 45 %, on ajoute une solution aqueuse d'HCl 6N (30 mL pour 1,5 mmol de cétoacide **5e**) au milieu réactionnel. Le milieu est ensuite porté à 120 °C pendant 4 h. Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans H₂O et le pH est ajusté à 7,0 par ajout d'une solution aqueuse de KOH à 1M. Le milieu est ensuite purifié par chromatographie d'échange d'ions comme le protocole général l'explique. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de (61 mg, 40 %).

Mp = 145 – 150 °C

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,99 (1H, ddd, $J = 5,3, 8,3$ et $15,1$ Hz, H^{3a}), 2,34 (1H, ddd, $J = 5,0, 9,5$ et $15,0$ Hz, H^{3b}), 2,74 (2H, m, H⁶), 2,98 (1H, dd, $J = 5,0$ et $8,0$ Hz, H²), 3,88 (1H, dd, $J = 5$ et 8 Hz, H⁴)

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ : 31,8 (C³), 35,9 (C⁶), 37,9 (C²), 52,7 (C⁴), 173,3, 175,8, 177,9 (C¹, C⁵ et C⁷)

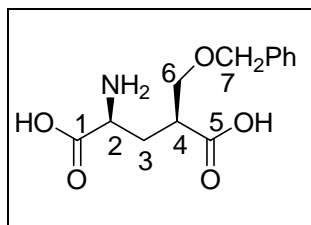
$[\alpha]_D^{25} = +8$ (c = 1,04, HCl 6N)

IR (KBr, cm⁻¹) : 3549-3053 (N-H v), 2520 (C-H alk v), 1724 (C=O acide v), 1637 (C=O aa v), 1520 (N-H δ), 1401, 1362 et 1336 (C-H δ), 1288, 1239 et 1192 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc pour C₇H₁₂NO₆ : 206,0665, exp : 206,0672

Analyses élémentaires : calc pour C₇H₁₁O₆N, 1,5 H₂O (%) C : 36,37, H : 5,67, N : 6,06
trouvées (%) C : 36,35, H : 5,64, N : 5,95

II.6 Acide (2S,4S)-4-(benzyloxymethyl)glutamique **33a**



($C_{13}H_{17}NO_5$, 267,28 g/mol)

Mp = 144 °C- 148°C

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,98 (1H, m, H^{3a}), 2,19 (1H, m, H^{3b}), 2,70 (1H, m, H^4), 3,69 (1H, dd, $J = 6,0$ et $10,0$ Hz, H^2), 3,73 (2H, dd, $J = 5,0$ et $9,0$ Hz, H^6), 4,56 (2H, s, H^7), 7,40 (5H, m, H^{ar})

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , pH 7,4) δ 30,0 (C^3), 44,8 (C^4), 53,2 (C^2), 71,4 (C^6), 72,8 (C^7), 128,2, 128,4 et 128,7 (CH^{ar}), 137,3 (C^{ar}), 174,2 (C^1), 180,1 (C^5)

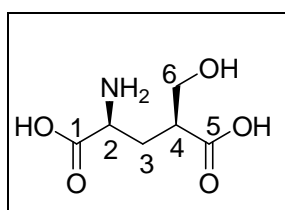
$[\alpha]_D^{25} = +31$ ($c = 1,07$, HCl 6N)

IR (KBr, cm^{-1}) : 3424-3040 (N-H v), 2625 (C-H v), 1701 (C=O acide v), 1647-1619 (C=O aa v), 1562 (N-H δ), 1405 et 1349 (C-H δ), 1218, 1147 et 1108 (C-O v), 729 et 696 (C-Har δ)

SM (ES^-) m/z calc pour $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_5$: 266,1028, exp : 266,1033

Analyses élémentaires : calc pour $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5$, $1/8 \text{ H}_2\text{O}$ (%) C : 57,93, H : 6,45, O : 30,42
trouvées (%) C : 57,91, H : 6,61, O : 30,13

II.7 Acide (2S,4S)-4-(hydroxymethyl)glutamique **33i**



($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_5$, 177,16 g/mol)

A une solution de produit benzylé **33a** (48 mg, 0,18 mmol) dissous dans H_2O (5 mL), est additionné du Pd/C à 10 % (10 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 4 h à température ambiante sous une atmosphère d'hydrogène en utilisant une baudruche. Après filtration sur membrane millipore et évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie échangeuse d'ions (résine fortement acide Dowex 50WX8, éluant : H_2O puis NH_4OH 1M). Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (31,8 mg, **quantitatif**).

Mp = 95-100 °C

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,98 (1H, ddd, $J = 4,5$, $8,2$ et $15,3$ Hz, H^{3a}), 2,29 (1H, ddd, $J = 5,2$, $9,8$ et $14,7$ Hz, H^{3b}), 2,76 (1H, m, H^4), 3,79 (1H, dd, $J = 5,9$ et $11,0$ Hz, H^{6a}), 3,82 (1H, dd, $J = 5,0$ et $9,0$ Hz, H^2), 3,83 (1H, dd, $J = 5,1$ et $11,3$ Hz, H^{6b})

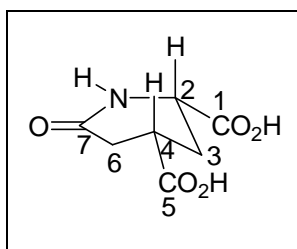
RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 29,8 (C^3), 46,9 (C^4), 53,3 (C^2), 63,3 (C^6), 174,3 (C^1), 180,6 (C^5)

$[\alpha]_D^{25} = +26$ ($c = 1,13$, HCl 6N)

IR (KBr, cm^{-1}) : 3404-3152 (N-H et O-H v), 2900 (C-H v), 1612 (C=O v), 1562 (N-H δ), 1402 et 1344 (C-H δ), 1150 et 1046 (C-O v)

SM (ES^+) m/z calc pour $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_5$: 178,0715, exp : 178,0719

II.8 Acide 6-oxopiperidine-2,4-dicarboxylique **34**



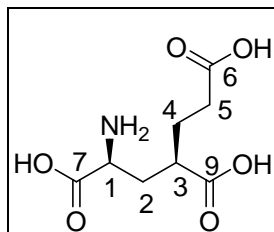
($C_7H_9NO_5$, 187,15 g/mol)

Après transamination du composé **5e**, le milieu réactionnel est purifié sur résine acide et élué avec une solution de NH_4OH 1M.

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ 2,50 (2H, ddd, $J = 6,0, 10,0$ et $14,3$ Hz, H^3), 2,50 (2H, ddd, $J = 3,2, 13,5$ et $14,0$ Hz, H^6), 2,93 (1H, m, H^4), 4,08 (1H, q, $J = 5,9$ et $10,0$ Hz, H^2)

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 27,3 (C^6), 32,0 (C^3), 36,7 (C^4), 54,4 (C^2), 171,4, 175,8 et 177,2 (C^1 , C^5 et C^7).

II.9 Acide (1S,3R) 1,3,5-tricarboxylic-1-aminopentane **33s**



($C_8H_{13}NO_6$, 219,19 g/mol)

Lorsque le taux de conversion de la transamination du composé **5g** (1 mmol) atteint 45 %, on ajoute une solution aqueuse d' HCl 6N (25 mL) au milieu réactionnel. Le milieu est ensuite porté à 120 °C pendant 4 h. Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans H_2O et le pH est ajusté à 7,0 par ajout d'une solution aqueuse de KOH à 1M. Le milieu est ensuite purifié par chromatographie d'échange d'ions comme le protocole général l'explique. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de (90 mg, **41 %**).

Mp = 95 – 100 °C

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,88 (2H, m, H^4), 1,92 (1H, m, H^{2a}), 2,26 (1H, ddd, $J = 5,5, 9,5$ et $15,0$ Hz, H^{2b}), 2,43 (2H, td, $J = 3,1$ et $7,5$ Hz, H^5), 2,62 (1H, m, H^3), 3,78 (1H, dd, $J = 5,6$ et $8,2$ Hz, H^1)

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ : 26,9 (C^4), 31,1 (C^5), 32,2 (C^2), 41,2 (C^3), 52,8 (C^1), 173,4, 177,6, 178,5 (C^6 , C^7 et C^9)

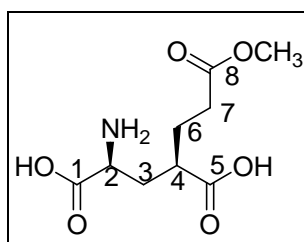
$[\alpha]_D^{25}$ (HCl 6N, $c = 1,1$) = + 6,4

IR (KBr, cm^{-1}) : 3550, 3480 et 3416 (N-H et O-H v), 3238 (C-H alk v), 1637 et 1620 (C=O v), 1520 (N-H δ), 1404 (C-H δ), 1111 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc pour $C_8H_{14}NO_6$: 220,0821, exp: 220,0815

Analyses élémentaires : calc pour $C_7H_{13}O_6N$, 1,2 H_2O (%) C : 39,90, H : 6,44, N : 5,81
trouvées (%) C : 40,04, H : 6,23, N : 5,68

II.10 Acide (2S,4R)-4-(3-methoxy-3-oxopropyl)glutamique **33g**



($C_9H_{15}NO_6$, 233,22 g/mol)

Après transamination, le milieu réactionnel est directement purifié sur résine basique (Dowex 2x8-400 ion).

Mp = 135 – 138 °C

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,90 (2H, m, H⁶), 1,94 (1H, m, H^{3a}), 2,25 (1H, ddd, *J* = 5,2, 9,6 et 14,8 Hz, H^{3b}), 2,47 (2H, td, *J* = 1,5 et 7,5 Hz, H⁷), 2,59 (1H, m, H⁴), 3,69 (3H, s, OCH₃), 3,75 (1H, dd, *J* = 5,5 et 8,5 Hz, H²)

RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ: 25,3 (C⁶), 31,2 (C⁷), 32,5 (C³), 41,8 (C⁴), 52,2 (OCH₃), 53,1 (C²), 173,0 (C⁸), 176,2 (C¹), 179,2 (C⁵)

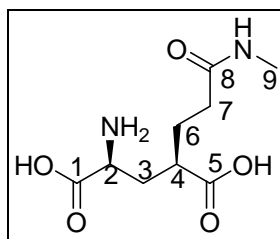
[α]_D²⁵ (HCl 6N, 26 °C, c = 1,02) = + 29

IR (KBr, cm⁻¹) : 3426 (N-H et O-H v), 3232 et 2941 (C-H alkyles v), 1724 et 1703 (C=O ester et acide v), 1636 et 1620 (C=O aa v), 1495 (N-H δ), 1443 et 1407 (C-H δ), 1214 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc pour C₉H₁₆NO₆ : 234,0978, exp : 234,0982

Analyses élémentaires : calc pour C₉H₁₅NO₆, 2/3 H₂O (%) C : 44,08, H : 6,71, N : 5,75
trouvées (%) C : 44,12, H : 6,60, N : 5,81

II.11 Acide (2S,4R)-4-(3-(methylamino)-3-oxopropyl)glutamique **33n**



(C₉H₁₆N₂O₅, 232,23 g/mol)

Mp = 124-130 °C

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,56 (2H, m, H⁶), 1,63 (1H, ddd, *J* = 5,2, 8,6 et 14,0 Hz, H^{3a}), 1,93 (1H, ddd, *J* = 4,8, 9,8 et 14,0 Hz, H^{3b}), 1,98 (2H, m, H⁷), 2,25 (1H, m, H⁴), 2,41 (3H, s, H⁹), 3,45 (1H, dd, *J* = 5,0 et 8,7 Hz, H²)

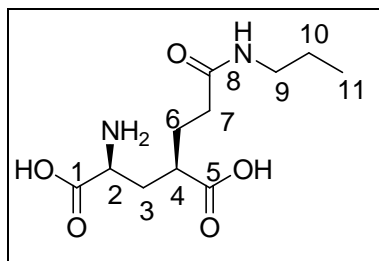
RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ: 25,8 (C⁹), 28,15 (C⁶), 32,5 (C³), 33,1 (C⁷), 42,2 (C⁴), 53,1 (C²), 173,8 (C⁸), 176,0 (C¹), 179,4 (C⁵)

[α]_D²⁵ (HCl 6N, 26 °C, c = 1,00) = + 30

IR (KBr, cm⁻¹) : 3426, 3419 (N-H et O-H v), 3232 et 2941 (C-H alk v), 1702 (C=O acide v), 1636 et 1620 (C=O aa v), 1557 (N-H δ), 1407 (C-H δ), 1267, 1163 (C-O v)

MS (ES+) m/z calc pour C₉H₁₆N₂O₅Na : 255,0957, exp : 255,0961

II.12 Acide (2S,4R)-4-(3-(propylamino)-3-oxopropyl)glutamique **33o**



(C₁₁H₂₀N₂O₅, 260,29 g/mol)

Mp = 145-150 °C

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 0,78 (3H, t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, H^{11}), 1,39 (2H, st, $J = 7,5 \text{ Hz}$, H^{10}), 1,79 (2H, m, H^6), 1,83 (1H, ddd, $J = 4,5, 8,0 \text{ et } 15,0 \text{ Hz}$, H^{3a}), 2,15 (1H, ddd, $J = 5,4, 9,7 \text{ et } 15,0 \text{ Hz}$, H^{3b}), 2,19 (2H, m, H^7), 2,48 (1H, m, H^4), 3,02 (3H, t, $J = 6,9 \text{ Hz}$, H^9), 3,67 (1H, dd, $J = 5,5 \text{ et } 8,2 \text{ Hz}$, H^2)

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ : 10,5 (C^{11}), 25,8 (C^9), 21,7 (C^{10}), 28,2 (C^6), 32,4 (C^3), 33,2 (C^7), 41,2 (C^9), 41,8 (C^4), 53,1 (C^2), 173,7 (C^8), 175,3 (C^1), 178,9 (C^5)

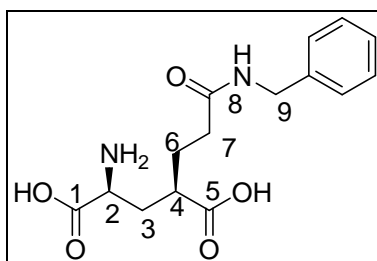
$[\alpha]_D^{25}$ (HCl 6N, c = 1,01) = + 27

IR (KBr, cm^{-1}) : 3486, 3412 (N-H et O-H v), 3123 et 2947 (C-H alk v), 1695 (C=O acide v), 1650 et 1617 (C=O aa v), 1560, 1506 (N-H δ), 1410 (C-H δ), 1226, 1154 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$: 283,1270, exp : 283,1277

Analyses élémentaires : calc pour $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2$ (%) C : 50,76, H : 7,74, N : 10,76
trouvées (%) C : 50,67, H : 7,78, N : 11,09

II.13 Acide (2S,4R)-4-(3-(benzylamino)-3-oxopropyl)glutamique **33p**



($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$, 308,33 g/mol)

Mp = 110-115 °C

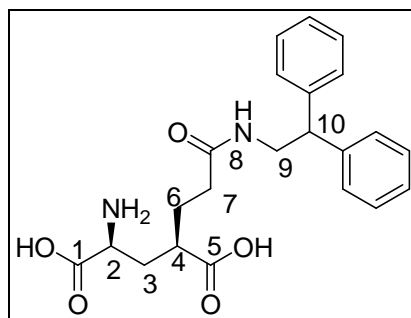
RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,93 (2H, m, H^6), 1,96 (1H, ddd, $J = 4,4, 7,2 \text{ et } 11,6 \text{ Hz}$, H^{3a}), 2,34 (3H, m, $\text{H}^7 \text{ et } \text{H}^{3b}$), 2,69 (1H, m, H^4), 4,02 (1H, t, $J = 7,2 \text{ Hz}$, H^2), 4,32 (2H, s, H^9), 7,35 (5H, m, Har)

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 27,9 (C^6), 32,0 (C^3), 33,8 (C^7), 40,9 (C^4), 43,0 (C^9), 51,4 (C^2), 127,2, 127,4 et 128,8 (CHar), 137,9 (Car), 171,4 (C^8), 175,0 (C^1), 177,8 (C^5)

$[\alpha]_D^{25}$ (HCl 6N, c = 1,07) = + 22

IR (KBr, cm^{-1}) : 3481, 3415 (N-H et O-H v), 3232 et 2910 (C-H alk v), 1718 (C=O acide v), 1635 et 1620 (C=O aa v), 1552 (N-H δ), 1449, 1407 (C-H δ), 1231, 1158 (C-O v), 735, 693 (C-Har δ)

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$: 331,1270, exp : 331,1268

II.14 Acide (2*S*,4*R*)-4-(3-(2,2-diphenylethylamino)-3-oxopropyl)glutamique **33q**

($C_{22}H_{26}N_2O_5$, 398,45 g/mol)

Mp = 135-139 °C

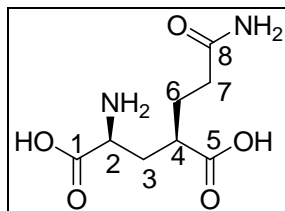
RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,68 (2H, m, H^6), 1,87 (1H, ddd, $J = 4,4, 7,3$ et $14,7$ Hz, H^{3a}), 2,12 (2H, t, $J = 7,3$ Hz, H^7), 2,25 (1H, ddd, $J = 2,3, 7,0$ et $14,8$ Hz, H^{3b}), 2,50 (1H, m, H^4), 3,82 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H^9), 3,94 (1H, t, $J = 7,1$ Hz, H^2), 4,24 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H^{10}), 7,24 (2H, m, Har), 7,33 (8H, m, Har)

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 27,9 (C^6), 31,3 (C^3), 32,7 (C^7), 40,7 (C^4), 43,3 (C^9), 49,9 (C^{10}), 51,3 (C^2), 127,0 (2 x CHar), 127,9 et 128,9 (4 x CHar), 142,1 (2 x Car), 171,4 (C^8), 175,0 (C^1), 177,8 (C^5)

$[\alpha]_D^{25}$ (HCl 6N, $c = 0,94$) = + 16,8

IR (KBr, cm^{-1}) : 3549, 3466, 3404 (N-H et O-H v), 3237 (C-H ar et alk v), 1721 (C=O acide v), 1638 et 1617 (C=O aa v), 1560 (N-H δ), 1239, 1103 (C-O v), 621 (C-Har δ)

SM (ES+) m/z calc pour $C_{22}H_{26}N_2O_5Na$: 421,1739, exp : 421,1742

II.15 Acide (2*S*,4*R*)-4-(3-amino-3-oxopropyl)glutamique **33m**

($C_8H_{14}O_5N_2$, 218,21 g/mol)

Mp = 120-125 °C

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,90 (2H, m, H^6), 1,95 (1H, ddd, $J = 4,6, 10,0$ et $15,0$ Hz, H^{3a}), 2,27 (1H, ddd, $J = 5,3, 9,5$ et $15,0$ Hz, H^{3b}), 2,32 (2H, td, $J = 2,5$ et $6,5$ Hz, H^7), 2,62 (1H, m, H^4), 3,78 (1H, dd, $J = 5,4$ et $8,3$ Hz, H^2)

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 27,8 (C^6), 32,3 (C^3 et C^7), 41,6 (C^4), 53,3 (C^2), 173,6 (C^8), 178,5 (C^1), 177,7 (C^5)

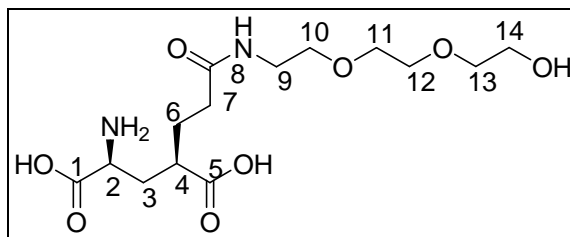
$[\alpha]_D^{25}$ (HCl 6N, $c = 1,00$) = + 34,2

IR (KBr, cm^{-1}) : 3427 et 3196 (N-H et O-H v), 2937 (C-H ar et alk v), 1655 et 1617 (C=O v), 1503 (N-H δ), 1446 et 1409 (C-H δ alk), 1342 (C-O v)

SM (ES-) m/z calc pour $C_8H_{13}O_5N_2$: 217,0824, exp : 217,0838

Analyses élémentaires : calc pour $C_8H_{14}O_5N_2 \cdot 1,2 H_2O$ (%) C : 40,06, H : 6,89, N : 11,68
trouvées (%) C : 39,55, H : 6,34, N : 11,50

*II.16 Acide (2S,4R)-4-(3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethylamino)-3-oxopropyl)glutamique **33r***



($C_{14}H_{26}N_2O_8$, 350,36 g/mol)

Mp = 70-75 °C

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,84 (2H, m, H^6), 1,89 (1H, ddd, $J = 4,4, 8,0$ et $15,0$ Hz, H^{3a}), 2,20 (1H, ddd, $J = 5,4, 9,3$ et $15,0$ Hz, H^{3b}), 2,25 (2H, m, H^7), 2,55 (1H, m, H^4), 3,33 (2H, t, $J = 5,3$ Hz, H^9), 3,57 (4H m, H^{10} et H^{13}), 3,63 (4H, m, H^{11} et H^{12}), 3,67 (2H, t, $J = 4,5$ Hz, H^{14}), 3,71 (1H, dd, $J = 8,3$ et $5,3$ Hz, H^2)

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ : 28,0 (C^6), 32,3 (C^3), 33,1 (C^7), 38,9 (C^9), 41,6 (C^4), 52,9 (C^2), 60,3 (C^{14}), 68,7 (C^{10}), 69,4 (C^{11} ou 12), 69,5 (C^{11} ou 12), 71,7 (C^{13}), 173,6 (C^8), 175,6 (C^1), 178,6 (C^5)

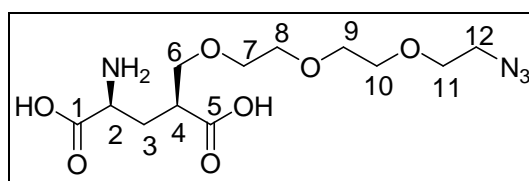
$[\alpha]_D^{25}$ (HCl 6N, c = 1,08) = + 19

IR (KBr, cm^{-1}) : 3497, 3409 (N-H et O-H v), 3113 et 2937 (C-H alkyles v), 1710 (C=O acide v), 1636 (C=O aa v), 1560 (N-H δ), 1456, 1339 (C-H δ), 1249, 1093 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc pour $C_{14}H_{26}N_2O_8Na$: 373,1587, exp : 373,1577

Analyses élémentaires : calc pour $C_{14}H_{26}O_8N_2$, 1,75 H_2O (%) C : 44,03, H : 7,78, N : 7,33
trouvées (%) C : 44,01, H : 7,39, N : 7,62

*II.17 Acide (2S,4S)-4-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique **33b***



($C_{12}H_{22}O_7N_4$, 334,33 g/mol)

Mp = 104-106 °C

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 2,01 (1H, ddd, $J = 4,9, 8,3$ et $14,8$ Hz, H^{3a}), 2,30 (1H, ddd, $J = 5,3, 9,0$ et $14,6$ Hz, H^{3b}), 2,89 (1H, m, H^4), 3,49 (2H, t, $J = 4,9$ Hz, H^{12}), 3,70 (10H, m, 5 x OCH_2), 3,76 (2H, d, $J = 5,9$ Hz, H^6), 3,82 (1H, dd, $J = 4,0$ et $9,6$ Hz, H^2)

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ : 29,5 (C^3), 42,7 (C^4), 50,1 (C^{12}), 53,0 (C^2), 69,1, 69,4, 69,48, 69,51, 69,8 (5 x OCH_2), 71,2 (C^6), 173,6 (C^1), 177,3 (C^5)

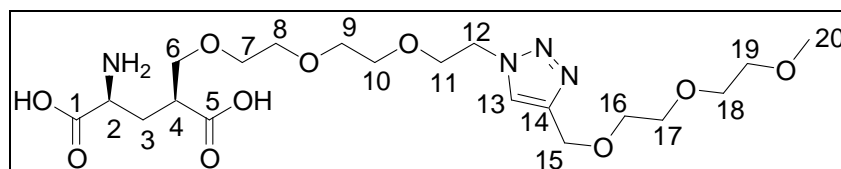
$[\alpha]_D^{25}$ (HCl 6N, c = 0,98) = + 17,6

IR (KBr, cm^{-1}) : 3422 et 3258 (N-H et O-H v), 3092, 2926 et 2874 (C-H alk v), 2117 (N_3 v), 1706 (C=O acide v), 1620 (C=O aa v), 1508 (N-H δ), 1482 (C-H δ), 1298, 1254 et 1125 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc pour $C_{12}H_{23}O_7N_4$: 335,1567, exp : 335,1569

Analyses élémentaires : calc pour $C_{12}H_{22}O_7N_4$, 1/3 H_2O (%) C : 42,31, H : 6,71, N : 16,46
trouvées (%) C : 42,37, H : 6,73, N : 16,58

*II.18 Acide (2S,4S)-4-((2-(2-(2-(4-((2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique **33t***



($C_{20}H_{36}N_4O_{10}$, 492,52 g/mol)

A une solution du composé **33b** (0,04 g, 0,12 mmol) dans MeOH (0,2 mL), on ajoute successivement l'alcyne **35** (19 mg, 0,12 mmol), la solution aqueuse de $CuSO_4$ 0,1 M (0,12 mL, 0,012 mmol), H_2O (0,4 mL) et la solution aqueuse d'acide ascorbique 0,3 M (0,12 mL, 0,036 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 1 h. Le milieu est ensuite est déposé sur une colonne de résine fortement acide (Dowex^(R) 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée abondamment à l'eau puis avec une solution aqueuse en NH_4OH 1M. Les fractions contenant le produit souhaité sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Le résidu est repris dans un minimum d'eau et est déposé sur une résine fortement basique (DOWEX^(R) 2X8-400). La colonne est éluée à l'eau puis avec un gradient d'AcOH (0,1 à 2M). Les fractions contenant le produit désiré sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est ensuite lyophilisé. Le produit est ainsi isolé sous la forme d'un solide très hygroscopique (41 mg, **70 %**).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,99 (1H, ddd, $J = 4,8, 8,8$ et $15,4$ Hz, H^{3a}), 2,27 (1H, ddd, $J = 4,6, 9,0$ et $15,0$ Hz, H^{3b}), 2,80 (1H, m, H^4), 3,59 à 3,73 (18H, m, 9 x OCH_2), 3,79 (1H, dd, $J = 5,0$ et $8,8$ Hz, H^2), 3,97 (2H, d, $J = 5,0$ Hz, H^{11}), 4,64 (2H, t, $J = 5,0$ Hz, H^{12}), 4,69 (2H, s, H^{15}), 8,00 (1H, s, H^{13})

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ : 29,8 (C^3), 43,5 (C^4), 50,0 (C^{12}), 53,2 (C^2), 58,0 (C^{20}), 63,0 (C^{15}), 68,7 et 68,9 (OCH_2), 69,37 à 69,44 (4 x OCH_2), 69,6, 69,7, 70,9 et 71,5 (OCH_2), 125,5 (C^{13}), 143,8 (C^{14}), 173,9 (C^1), 178,2 (C^5)

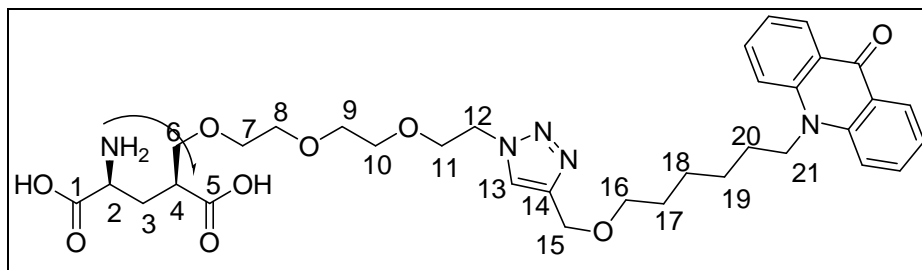
$[\alpha]_D^{25}$ (HCl 6N, c = 1,02) = + 15,2

IR (KBr, cm^{-1}) : 3435 et 3134 (N-H et O-H v), 2877 (C-H alk v), 1715 (C=O acide v), 1629 (C=O aa v), 1455 et 1352 (C-H δ), 1246 et 1101 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc pour $C_{20}H_{37}N_4O_{10}$: 493,251, exp : 493,2505

Analyses élémentaires : calc pour $C_{20}H_{36}N_4O_{10}$, 4/3 H_2O (%) C : 46,50, H : 7,54, N : 10,84
trouvées (%) C : 46,81, H : 7,48, N : 11,13

*II.19 Acide (2S,4S)-4-((2-(2-(2-(4-((6-(9-oxoacridin-10(9H)-yl)hexyloxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique **33u***



($C_{34}H_{45}N_5O_9$, 667,75 g/mol)

A une solution du composé **33b** (100 mg, 0,3 mmol) dans tBuOH (3 mL), on ajoute successivement l'alcyne **37** (98 mg, 0,3 mmol), la solution aqueuse de $CuSO_4$ 0,1 M (0,3 mL, 0,03 mmol), H_2O (1 mL) et la solution aqueuse d'acide ascorbique 0,3 M (0,3 mL, 0,09 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 2 h. Le milieu réactionnel est ensuite déposé sur une colonne de résine fortement acide (Dowex^(R) 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée abondamment au MeOH puis avec un mélange 1/1 d'une solution aqueuse en NH_4OH 1M et de MeOH. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune (165 mg, **82 %**). Le produit est obtenu exclusivement sous une forme cyclique.

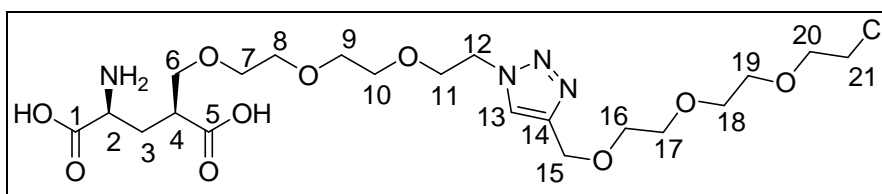
RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,49 à 1,69 (6H, m, H^{17} , H^{18} , H^{19}), 1,92 (2H, m, H^{20}), 2,25 (1H, ddd, $J = 4,0, 9,5$ et $13,5$ Hz, H^{3a}), 2,42 (1H, m, H^{3b}), 2,67 (1H, m, H^4), 3,54 à 3,68 (12H, m, 6 x OCH_2), 3,87 (2H, t, $J = 5,0$ Hz, H^{16}), 4,00 (1H, dd, $J = 4,3$ et $9,2$ Hz, H^2), 4,52 (2H, t, $J = 8,0$ Hz, H^{12}), 4,58 (2H, t, $J = 5,2$ Hz, H^{21}), 4,62 (2H, s, H^{15}), 7,36 (2H, t, $J = 7,4$ Hz, 2 x Har), 7,82 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, 2 x Har), 7,86 (2H, td, $J = 6,8$ et $1,6$ Hz, 2 x Har), 8,0 (1H, s, H^{13}), 8,47 (2H, dd, $J = 8,1$ et $1,5$ Hz, 2 x Har)

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ : 27,0, 27,4, 28,3 et 30,6 (C^{20} , C^{19} , C^{18} et C^{17}), 30,8 (C^3), 43,3 (C^4), 43,9 (C^{12}), 51,4 (C^{21}), 57,9 (C^2), 64,7 (C^{15}), 70,4 (C^{16}), 70,35 (OCH_2), 71,4 (3 x OCH_2), 71,5 et 71,8 (OCH_2), 116,8 (2 x Char), 122,6 (2 x Char), 123,0 (2 x Car), 125,8 (C^{13}), 128,2 (2 x Char), 135,7 (2 x Char), 143,2 (2 x Car), 146,0 (C^{14}), 179,7, 179,9 et 180,4 (C^1 , C^5 et C_{acridone})

IR (KBr, cm^{-1}) : 3391 et 3248 (N-H et O-H v), 2932 (C-H alk v), 1695 et 1682 (C=O v), 1598 (N-H δ), 1494 et 1461 (C-H δ), 1290-1264 et 1107 (C-O v)

SM (ES+) m/z calc $C_{34}H_{45}N_5O_9 - H_2O$: 650,3190, exp : 650,3205

*II.20 Acide (2S,4S)-4-((2-(2-(2-(4-((2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique **33x***

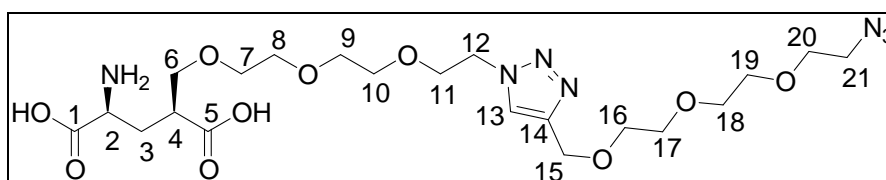


($C_{21}H_{37}O_{10}N_4Cl$, 540,99 g/mol)

A une solution du composé **33b** (40 mg, 0,12 mmol) dans tBuOH (1 mL), on ajoute successivement l'alcyne **40** (30 mg, 0,12 mmol), la solution aqueuse de CuSO₄ 0,1 M (0,12 mL, 0,012 mmol), H₂O (0,26 mL) et la solution aqueuse d'acide ascorbique 0,3 M (0,12 mL, 0,036 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 3 h. Le milieu réactionnel est ensuite déposé sur une colonne de résine fortement acide (Dowex^(R) 50WX8, 200-400 mesh, H⁺). La résine est lavée abondamment avec H₂O puis avec une solution aqueuse en NH₄OH 1M. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc hygroscopique (52 mg, **80 %**).

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,99 (1H, ddd, *J* = 4,5, 11,0 et 15,4 Hz, H^{3a}), 2,21 (1H, ddd, *J* = 4,5, 9,5 et 15,0 Hz, H^{3b}), 2,68 (1H, m, H⁴), 3,61 à 3,83 (23H, m, 11 x OCH₂ et H²), 3,98 (2H, d, *J* = 5,0 Hz, H¹¹), 4,64 (2H, t, *J* = 4,8 Hz, H¹²), 4,70 (2H, s, H¹⁵), 8,09 (1H, s, H¹³)
 RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ : 30,2 (C³), 43,1 (C²¹), 45,1 (C⁴), 50,0 (C¹²), 53,4 (C²), 63,0 (C¹⁵), 68,7 et 68,9 (OCH₂), 69,4 et 69,6 (4 x OCH₂), 70,8 et 72,2 (OCH₂), 125,5 (C¹³), 143,8 (C¹⁴), 174,3 (C¹), 180,3 (C⁵)

*II.21 Acide (2S,4S) -4-((2-(2-(2-(4-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique **33y***

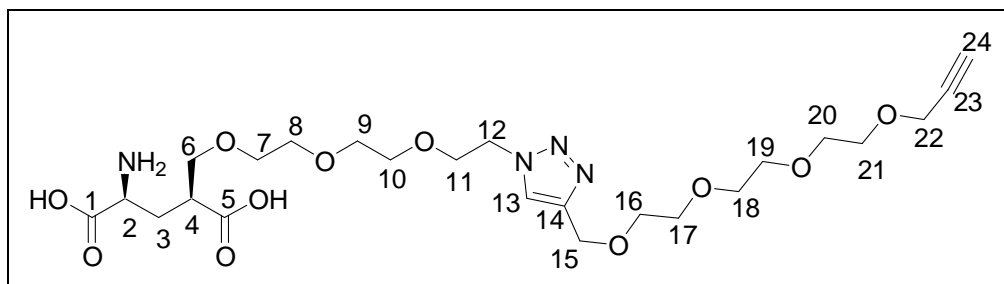


(C₂₁H₃₇O₁₀N₇, 547,56 g/mol)

Le composé **33x** (51 mg, 0,094 mmol) est dissous dans H₂O (1 mL). Le NaN₃ (24 mg, 0,47 mmol) et le NH₄Cl (24 mg) sont ajoutés. Le milieu est chauffé à 70 °C pendant 5 jours. Un minimum d'eau ajouté est additionné au milieu pour dissoudre le NH₄Cl en suspension. Le milieu est ensuite évaporé sous pression réduite et analysé par RMN (100 mg, **quantitatif**). D'après la RMN, il s'est formé 75 % de produit.

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) δ : 1,99 (1H, ddd, *J* = 4,5, 9,1 et 15,0 Hz, H^{3a}), 2,21 (1H, ddd, *J* = 3,6, 9,3 et 15,0 Hz, H^{3b}), 2,68 (1H, m, H⁴), 3,51 (2H, t, *J* = 5,0 Hz, H²¹), 3,53 à 3,79 (23H, m, 11 x OCH₂ et H²), 3,98 (2H, d, *J* = 5,0 Hz, H¹¹), 4,46 (2H, t, *J* = 4,8 Hz, H¹²), 4,47 (2H, s, H¹⁵), 8,13 (1H, s, H¹³)
 RMN ¹³C (100MHz, D₂O) δ : 30,5 (C³), 45,5 (C⁴), 50,20 (C¹²), 50,3 (C²¹), 53,6 (C²), 63,2 (C¹⁵), 68,7 à 72,2 (11 x OCH₂), 125,6 (C¹³), 144,1 (C¹⁴), 174,5 (C¹), 180,7 (C⁵)
 SM (ES+) *m/z* calc pour C₂₁H₃₈N₇O₁₀ : 548,2680, exp: 548,2709.

Acide (2S,4S)-2-amino-4-((2-(2-(2-(4-(2-(2-(2-(prop-2-ynyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)glutamique **33w**

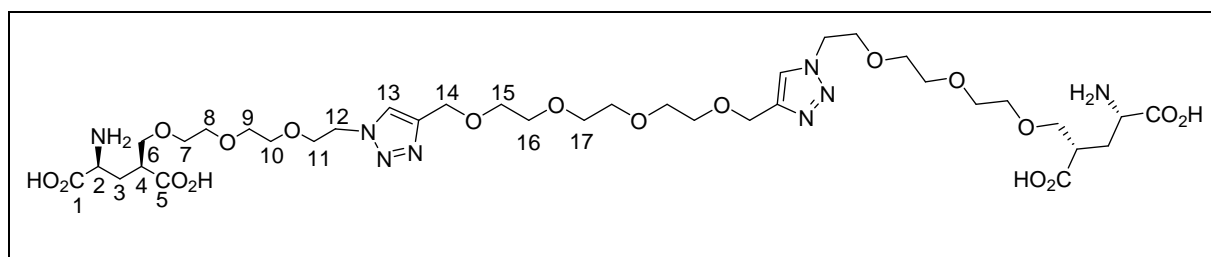


($C_{23}H_{38}N_4O_{11}$, 546,57 g/mol)

A une solution du composé **33b** (50 mg, 0,12 mmol) dans tBuOH (1 mL), on ajoute successivement l'alcyne **39** (36 mg, 0,12 mmol), la solution aqueuse de $CuSO_4$ 0,1 M (0,12 mL, 0,012 mmol), H_2O (0,26 mL) et la solution aqueuse d'acide ascorbique 0,3 M (0,12 mL, 0,036 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 10 h. Le milieu réactionnel est ensuite déposé sur une colonne de résine fortement acide (Dowex^(R) 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée abondamment avec H_2O puis avec une solution aqueuse en NH_4OH 1M. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le produit est ourifié sur résine basique (éluant : AcOH 0,1M) et isolé sous la forme d'un solide blanc (12 mg, **18 %**).

RMN 1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,92 (1H, ddd, $J = 4,5, 9,1$ et $15,0$ Hz, H^{3a}), 2,25 (1H, ddd, $J = 3,6, 9,3$ et $15,0$ Hz, H^{3b}), 2,79 (1H, t, $J = 2,2$ Hz, H^{24}), 2,83 (1H, m, H^4), 3,25-3,67 (22H, m, 11 x OCH_2), 3,80 (1H, dd, $J = 5,7$ et $7,8$ Hz, H^2), 3,89 (2H, d, $J = 5,0$ Hz, H^{11}), 4,15 (2H, s, H^{22}), 4,55 (2H, t, $J = 5,2$ Hz, H^{12}), 4,60 (2H, s, H^{15}), 8,01 (1H, s, H^{13}).

II.22 Diglutamate **33v**



($C_{36}H_{62}N_8O_{18}$, 894,92 g/mol)

A une solution du composé **33b** (50 mg, 0,15 mmol) dans tBuOH (1 mL), on ajoute successivement l'alcyne **38** (16 mg, 0,06 mmol), la solution aqueuse de $CuSO_4$ 0,1 M (0,12 mL, 0,015 mmol), H_2O (0,26 mL) et la solution aqueuse d'acide ascorbique 0,3 M (0,120 mL, 0,045 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant 5 h. Le milieu réactionnel est ensuite déposé sur une colonne de résine fortement acide (Dowex^(R) 50WX8, 200-400 mesh, H^+). La résine est lavée abondamment à H_2O puis avec une solution aqueuse en NH_4OH 1M. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le produit est purifié sur résine basique et élué avec une solution AcOH 0,1M. Le produit est isolé sous la forme d'un solide blanc (17 mg, **31 %**).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ : 1,77 (2H, m, 2 x H^{3a}), 2,02 (1H, 2 x H^{3b}), 2,54 (2H, m, 2 x H^4), 3,35 à 3,49 (34 H, m, 16 x OCH_2 et 2 x H^2), 3,74 (4H, t, $J = 5,0 \text{ Hz}$, 2 x H^{11}), 4,39 (4H, m, 2 x H^{12}), 4,46 (4H, m, 2 x H^{15}), 7,86 (1,5 H, s, 2 x H^{13})

RMN ^{13}C (100MHz, D_2O) δ : 30,0 (2 x C^3), 44,0 (2 x C^4), 50,0 (2 x C^{12}), 53,2 (2 x C^2), 62,9 (2 x C^{14}), 68,7-71,7 (OCH_2), 125,5 (2 x C^{13}), 144,8 (2 x C^{14}), 174,0 (2 x C^1), 180,5 (2 x C^5)

SM (ES+) m/z calc pour $\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{N}_8\text{O}_{18}$: 893,4104, exp : 893,4129.

Chapitre III Enzymologie

III.1 Généralités

Toutes les solutions sont préparées en utilisant un tampon phosphate de potassium 0,1M, pH = 7,6. Les enzymes disponibles sous la forme de suspension dans le sulfate d'ammonium 3M, sont centrifugées (3min, 10 000 tours/min) et les culots sont solubilisés dans le tampon phosphate. Toutes les mesures cinétiques sont réalisées à 340 nm et dans des cuves de spectrophotomètre à usage unique en polystyrène avec un trajet optique de 1cm. Le spectrophotomètre utilisé est HITACHI modèle U2010. Les mesures d'activité ont été aussi effectuées entre 20 et 25 °C dans un laboratoire climatisé.

Les enzymes commerciales sont disponibles chez Sigma : AspAT de cœur de porc (E.C.2.6.1.1, 36 UI/mL), MDH de cœur de bovin (E.C.1.1.1.3.7, 741 UI/mL), LDH du muscle de lapin (E.C.1.1.1.27, 66 UI/mL), GluDH de foie de bovin (E.C.1.4.1.3, 2 UI/mL), LeuDH de *Bacillus* (E.C.1.4.1.9, 41 UI/mL).

Les UI indiquées correspondent aux vitesses maximales mesurées avec les substrats naturels dans les conditions standards. Pour les ATs, les conditions sont les suivantes :

- AspAT d'*E.coli* : tampon phosphate de K 0,1M, pH 7,6, Asp 40 mM, KG 4 mM
- BCAT d'*E.coli* : tampon phosphate de K 0,1M, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, pH 7,6, Glu 40 mM, MOPA (acide 4-méthyl-2-oxo-pentanoïque) 4mM.

Dans les protocoles de mesures d'activité, les concentrations indiquées en parenthèse correspondent aux valeurs finales dans la cuve de mesure.

III.2 Protocole du dosage d'activité pour la détermination des paramètres cinétiques d'un substrat de l'AspAT

Dans une cuve sont introduits : 20μl d'une solution de NADH à 10mg/mL (0,2 mM); 10μL d'une solution de MDH (malic deshydrogenase) à 200 UI/mL (2UI); 5μl d'une solution d'AspAT diluée de façon à avoir une durée de réaction comprise entre 100 et 600 s, 5-20μl d'une solution de KG 0,02M ou 0,2M (0,1-4mM); QSP 1mL de tampon phosphate 0,1 M contenant Asp 40 mM et à pH = 7,6.

La variation de DO à 340 nm est alors mesurée en fonction du temps. La vitesse de la réaction (v_i) est alors calculée en utilisant $\epsilon_{\text{NADH},340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Les paramètres cinétiques sont ensuite déterminées en utilisant le traitement graphique de Hanes-Woolf ($(S)/V = f(S)$; $(S)/V = S/V_m + V_m/K_m$). Chaque droite comporte un minimum de 5 points (concentration en substrat), chacun correspondant à la moyenne de 2 ou 3 mesures expérimentales. Les données brutes sont traités avec le logiciel Excel qui permet une regression linéaire et de calculer les valeurs de la pente et de l'ordonnée à l'origine ainsi que d'estimer les erreurs standards. Les incertitudes sur les valeurs de K_m , k_{cat} et k_{cat}/K_m sont par ailleurs calculées en utilisant les lois de propagation d'erreurs de Gauss.

III.3 Protocole pour l'étude de l'inhibition de l'AspAT par le 4-carboxyméthyl-KG 5d

Dans une cuve sont introduits : 20μl d'une solution de NADH à environ 10 mg/mL (0,2mM); 10μL d'une solution de MDH (malic deshydrogenase) à 200 UI/mL (2 UI); 10 μl d'une solution d'AspAT (10 UI/mL), 5 à 40 μl d'une solution d'inhibiteur potentiel à 0,2M (1-8mM); QSP 1mL de tampon phosphate 0,1M, Asp 40 mM, pH = 7,6. Après un temps d'incubation de 30 min à 25°C, on ajoute 10 μl de KG à 0,02M et on détermine la vitesse de transamination comme cela est décrit précédemment, en suivant l'évolution de la DO à 340 nm

en fonction du temps. La vitesse mesurée peut ensuite être comparée à celle déterminée sans inhibiteur dans la cuve.

III.4 Protocole du dosage d'activité pour la détermination des paramètres cinétiques d'un substrat de la BCAT avec la GluDH

Dans une cuve sont introduits : 20µl d'une solution de NADH à environ 10 mg/mL (0,2mM); 10µL d'une solution de GluDH à 200 UI/mL (2UI); 20µl d'une solution de BCAT diluée de telle façon à avoir une durée de transamination comprise entre 100 et 600 s, 5-20µl d'une solution de l'analogue du KG 0,02 M ou 0,2 M (0,1 - 4mM); QSP 1mL de tampon phosphate de potassium 0,1M Glu 40mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, pH = 7,6.

Les paramètres cinétiques sont déterminés comme cela a été décrit précédemment (III.2).

III.5 Protocole du dosage d'activité pour la détermination des paramètres cinétiques d'un substrat de la BCAT avec la LeuDH.

Dans une cuve sont introduits : 20µl d'une solution de NADH à environ 10 mg/mL (0,2mM); 10µL d'une solution de LeuDH à 50 UI/mL (1UI); 20µl d'une solution de BCAT diluée de telle façon à avoir une durée de transamination comprise entre 100 et 600 s, 5-40µl d'une solution de KG 0,02M ou 0,2M (0,1 - 4mM); QSP 1mL de tampon phosphate de potassium 0,1M, Leu 40mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, pH=7,6.

Les paramètres cinétiques sont déterminés comme cela a été décrit précédemment (III.2).

III.6 Protocole pour la détermination de la constante d'équilibre pour la transamination entre un donneur d'amine et le KG avec l'AspAT

On prépare une solution aqueuse contenant les 2 substrats en concentration égale (10 mM) dans le tampon phosphate. Un échantillon de 100 µL est prélevé et constitue la solution témoin. Après la détermination précise par dosage enzymatique de la concentration initiale en KG, 10 µL d'AspAT à 100 UI/ml est ajouté au milieu réactionnel. Le milieu est alors agité à Ta. La concentration en KG est déterminée toutes les 15 min par dosage enzymatique jusqu'à obtention d'un palier qui signifie que l'équilibre est atteint. Notons que la mesure de la concentration en KG de la solution témoin est également effectuée en parallèle toutes les 30 min pour vérifier que le KG ne se dégrade pas dans le milieu. La constante d'équilibre est ainsi déterminée à partir de la concentration finale en KG obtenue à l'équilibre. Le dosage témoin réalisé avec l'Asp est réalisé de la même façon à part que nous avons ajouté 10 µL d'AspAT à 1 UI/ml.

Le dosage du KG se fait selon le protocole général décrit dans le Chapitre II.

III.7 Protocole pour la culture des souches d'E.coli TYR903-AspC et la purification de l'AspAT d'E.coli

Culture des cellules :

La souche TYR903-AspC est conservée à -80 °C dans un milieu LB (10 g/L Trypton, 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl) et 10 % en glycerol. A partir d'un échantillon congelé de 3 mL, on effectue une pré-culture dans 100 mL de milieu LB en présence

d'ampicilline (0,3 mM) pendant 24 h à 30 °C. L'inoculum obtenu est ensuite introduit dans 5 L de milieu LB contenant de l'ampicilline (0,3 mM) et de l'IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactosidase) pendant 24 h à 4 °C. A l'issue de la culture, les cellules sont récoltées sous forme d'un culot par centrifugation à 8000 tours/min pendant 30 min à 25 °C. On reprend 10 g de culot cellulaire dans 100 mL de tampon DEAE (KH_2PO_4 10 mM, AcOK 10 mM, acide succinique 10 mM, mercaptoéthanol 5 mM, pH = 6,0) puis les cellules sont broyées sous une pression de 20 kPsi en utilisant un désintégrateur de (constant system LTP d'Amherst, modèle : 0014014A). Le broyat des cellules obtenu est dilué avec du tampon DEAE jusqu'à obtenir un volume total de 200 mL. On ajoute 200 μL d'une solution de phosphate de pyridoxal à 10 mM dont le pH a été ajusté à 7 par ajout d'une solution aqueuse de KOH. Deux centrifugations successives à 8 000 tours /min pendant 30 min sont effectuées afin d'éliminer les débris cellulaires. On obtient alors un extrait de protéines qui peut être conservé quelques jours à 5-10 °C.

Purification :

Les étapes de chromatographie sont effectuées en utilisant un système de chromatographie basse pression de marque Pharmacia installé dans une chambre froide (4-10 °C).

Chromatographie DEAE :

L'extrait brut est tout d'abord purifié par chromatographie sur résine DEAE-Toxopearl (DiEthylAminoEthyl). 200 mL de gel commercial est rincé avec 3 à 5 volumes d'eau chaude sur fritté, puis avec le tampon DEAE, 1 à 2 volumes. Le gel est ensuite décanté. Le surnageant est éliminé car il présente de fines particules qui peuvent colmater la colonne.

Le gel est ensuite introduit dans une colonne (120 mL), puis équilibré au moyen du tampon DEAE avec un débit de 0,5 mL/min pendant 20 h. L'extrait de protéines à purifier est alors déposée sur la colonne par gravité puis on procède à l'élution de la colonne avec un débit de 0,5 mL/min. L'élution s'effectue selon un gradient de concentration en NaCl de 0 à 0,5 M (3 volumes de colonne). On procède ensuite aux dosages de l'activité enzymatique et des protéines pour chaque fraction de 5 mL recueillie.

Notons que la phase DEAE peut être régénérée par rinçage avec un tampon DEAE 1M en NaCl (3 volumes de colonne) puis un tampon DEAE (3 volumes de colonne).

Chromatographie HA :

Une seconde purification de l'enzyme par chromatographie sur HA (hydroxyapatite) est ensuite réalisée. La colonne est montée avec une phase HA (150 mL, BIO-RAD) préalablement décantée et équilibrée avec le tampon HA (KH_2PO_4 2 mM, acide succinique 10 mM, mercaptoéthanol 5 mM, pH 7,0) avec un débit de 0,5 mL/min pendant 20 h. L'extrait de protéine issu de la purification par chromatographie DEAE et préalablement dialysé avec du tampon HA, est déposé sur la colonne par gravité puis on procède à son élution avec le tampon HA, un débit de 0,5 mL/min et un gradient de concentration en KH_2PO_4 allant de 2 à 100 mM (3 volumes). On procède ensuite aux dosages de l'activité enzymatique et des protéines pour chaque fraction recueillie et à leur analyse par électrophorèse SDS PAGE.

Notons que la phase HA peut être régénérée par rinçage avec un tampon HA à 200 mM en KH_2PO_4 (3 volumes de colonne) puis un tampon HA à 2 mM en KH_2PO_4 (3 volumes de colonne).

Les fractions d'enzymes sont mélangées puis dialysées avec une solution de sulfate d'ammonium (3M, 2 x 1L en 20h) afin d'obtenir la précipitation de l'enzyme. L'AspAT est

finalement stockée dans des ependorfs de 1 mL, en suspension dans une solution de sulfate d'ammonium, à + 4°C et peut être ainsi conservée quelques années sans perte d'activité.

Electrophorèse SDS PAGE :

Préparation du gel :

Le gel de séparation à 12,5 % en acrylamide est effectué en mélangeant 12,5 g d'acrylamide, 0,34 g de bis-acrylamide, 4,65 g de tris (tris(hydroxyméthyl(aminométhane)), 0,1 g de SDS, 10 g de Glycérol, QSP eau 100 mL. Le pH est ajusté à 8,8 par ajout d'HCl 1M. Le gel de concentration est à 5 % en acrylamide est effectué en mélangeant 5 g d'acrylamide, 0,14 g de bis acrylamide, 1,41 g de Tris et 0,05 SDS, QSD eau 50 mL, pH à 6,8 (HCl 1M). Entre deux plaques, on fait couler doucement environ 10 mL d'un mélange de 10 mL de gel de séparation, 23 µL de persulfate d'ammonium à 10 % et 5 µL de TEMED. Un peu d'eau est ajouté pour avoir une surface bien plane du gel. Le gel polymérise au bout de 30 min à Ta. L'eau est alors retirée à l'aide d'un papier filtre et on refait couler entre les deux plaques le mélange suivant : 20 µL de persulfate d'ammonium à 10 %, 2 µL de TEMED et 5 mL du gel de concentration avant polymérisation. Le mélange est recouvert d'un peigne pour faire les puits prévus pour déposer l'échantillon de protéines. La polymérisation se fait à Ta au bout de quelques heures. Le peigne est enlevé libérant ainsi les puits.

Préparation des échantillons de protéines :

20 µL d'échantillon protéique (contenant environ 20 µg de protéines) à étudier est dissous dans 20 µL de Tris à 0,1M et 20 µL d'une solution Laemmli (1,6 mL SDS 10 %, 0,4 mL mercaptoéthanol, 1 mL de Tris, 0,1 M, pH = 6,8, 0,8 mL de glycérol et quelques gouttes de bleu de bromophénol, QSP 8 mL avec H₂O). Le mélange est chauffé 5 minutes à 80 °C puis est déposé dans les puits prévus à cet effet.

La migration s'effectue alors en appliquant un champ électrique de 20 mV pour la concentration et 30 mV pour la séparation dans un tampon d'électrophorèse contenant 3,05 g de Tris, 14,25 g de glycine, 1g de SDS, pH = 6,8, QSD eau 1L.

Après migration, le gel est coloré pendant 30 min avec une solution contenant 55 mg de bleu de Coomassie, 95 mL de MeOH, 1 mL d'acide acétique et 95 mL d'eau. Il est ensuite décoloré par une solution contenant 90 mL de MeOH, 200 mL d'EtOH, 200 mL d'acide acétique, 50 mL de glycérol et 146 mL d'eau.

Dosage des protéines par la méthode Bradford :

Un échantillon de 100 µL est dosé par addition de 5 mL de solution de Bradford (100 mg de bleu de coomassie brillant G dans 50 mL d'EtOH, 100 mL d'acide phosphorique à 85 %, QSP eau 1L). Après agitation et incubation à Ta pendant 5 min, la DO est mesurée à 595 nm. Une gamme étalon allant de 0,2 à 1 mg/mL est réalisée avec une solution titrée d'albumine de sérum bovin (BSA). La concentration en protéines de l'échantillon (mg/mL) est déterminée en reportant les valeurs de DO sur la courbe étalon.

Dosage de l'activité spécifique de l'AspAT :

Dans une cuve sont introduits : 20µl d'une solution de NADH à environ 10mg/mL (0,2mM); 10µL d'une solution de MDH à 200 UI/mL (2UI); 5µl d'une solution d'AspAT diluée de telle façon à avoir une durée de transamination comprise entre 100 et 600 s, QSP 1mL de tampon phosphate 0,1M, Asp 40mM, pH = 7,6. Une fois la DO stabilisée, on ajoute

20 μ l d'une solution de KG à 0,2M et on mesure la DO à 340 nm en fonction du temps. La vitesse et donc l'activité de l'enzyme sont déterminées à partir de la pente de la droite représentant la DO en fonction du temps. Il suffit de diviser cette activité en UI/mL par la concentration en protéines (mg de protéines/mL) pour obtenir l'activité spécifique de l'AspAT en UI/mg de protéines.

RESUME

Le glutamate (Glu) est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central. Ses analogues peuvent se comporter comme des ligands sélectifs et sont intéressants pour élucider le rôle spécifique des différents types de transporteurs ou de récepteurs du système glutamatergique. Ce travail avait pour objectif de synthétiser de nouveaux analogues fonctionnalisés du Glu en utilisant les aminotransférases en tant que biocatalyseurs de façon à convertir les analogues de l'acide 2-oxoglutarique (KG) en analogues du Glu. La plupart des analogues du KG se sont avérés substrats de l'Aspartate Aminotransférase d'*E.coli* (AspAT) permettant la préparation stéréosélective des analogues du Glu correspondants. Une étude de modélisation moléculaire a été réalisée afin d'expliquer la spécificité de substrat de l'AspAT. Quatre analogues se sont comportés comme des ligands sélectifs et offrent des perspectives pour le développement de nouveaux analogues actifs dans le système glutamatergique.

Mots clés : Acide glutamique, Aspartate aminotransférase, Acide 2-oxoglutarique, transamination, bioconversion, modélisation moléculaire.

ABSTRACT

Glutamate (Glu) is the major excitatory neurotransmitter within the brain where numerous different specific receptors and transporters have been identified. Glu analogues can behave as selective ligands and are very important for elucidating the specific roles of these receptors. The object of this phd study was to prepare new functionalized Glu analogues using Aminotransférases as biocatalysts allowing the stereoselective conversion of 2-oxoglutaric analogues (KG) into Glu analogues. Many of these KG analogues proved to be good substrates of *E.coli* Aspartate Aminotransférase (AspAT) which allowed the stereoselective preparation of the corresponding Glu analogues. A modelling study has been performed to understand the AspAT substrate specificity. Four analogues displayed a high selectivity and offer today very interesting perspectives from the design of new drugs active in the glutamatergic system.

Key words : Glutamic acid, Aspartate aminotransferase, 2-oxoglutaric acid, transamination, bioconversion, molecular modelling.